

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 2月 4日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-028117

出 願 人

Applicant (s):

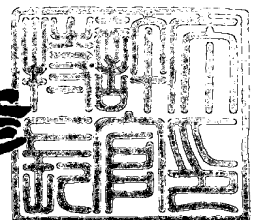
株式会社分子バイオホトニクス研究所



2000年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3021393

【書類名】 特許願

【整理番号】 MBP-161

【提出日】 平成12年 2月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子バイオホ
トニクス研究所内

 【氏名】 石橋 要

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子バイオホ
トニクス研究所内

 【氏名】 辻 明彦

【特許出願人】

 【識別番号】 595047385

 【氏名又は名称】 株式会社分子バイオホトニクス研究所

【代理人】

 【識別番号】 100088155

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

 【識別番号】 100092657

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 014708

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 特定の mRNA を発現した生細胞を含む生細胞群の細胞中に、該 mRNA を標識可能な標識剤を導入する第 1 の工程と、

前記標識剤で前記 mRNA を標識することにより、標識化 mRNA を含有する生細胞を含む生細胞群を得る第 2 の工程と、

前記標識化 mRNA を検出することにより該標識化 mRNA を含有する生細胞を同定し、同定した該生細胞を前記第 2 の工程で得られた前記生細胞群から選択的に分離する第 3 の工程と、

を含むことを特徴とする特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法。

【請求項 2】 前記第 1 の工程における標識剤が、前記 mRNA と相補的な塩基配列を有し、且つ蛍光色素で標識されたプローブであり、

前記第 2 の工程における標識化 mRNA が、該プローブと前記 mRNA とのハイブリッド体であり、

前記第 3 の工程において、該ハイブリッド体を含有する生細胞を含む生細胞群に光を照射して、該ハイブリッド体の形成に基づく前記蛍光色素の蛍光変化を検出することにより該蛍光変化を生じる生細胞を同定し、同定された該生細胞を前記第 2 の工程で得られた前記生細胞群から選択的に分離することを特徴とする請求項 1 記載の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法。

【請求項 3】 前記プローブが、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブからなり、

該第 1 のプローブと、該第 2 のプローブとは、前記 mRNA に対して隣接してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、

該第 1 のプローブがエネルギードナー蛍光色素で標識され、そして該第 2 のプローブがエネルギーアクセプター蛍光色素で標識されたものであり、

前記蛍光変化が、該第 1 のプローブのエネルギードナー蛍光色素から、該第 2 のプローブのエネルギーアクセプター蛍光色素への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) であることを特徴とする請求項 2 記載の特定の遺伝子を発現した生細胞

の選択的分離方法。

【請求項 4】 前記第 3 の工程における、前記蛍光変化を生じる生細胞の選択的分離が、セルソーター（FACS）により実施されることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法。

【請求項 5】 前記 mRNA が、サイトカインをコードする mRNA であることを特徴とする請求項 2 ～ 4 のいずれか一項に記載の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法。

【請求項 6】 前記 mRNA が、インターロイキン-2（IL-2）をコードする mRNA であり、前記第 1 のプローブが配列表の配列番号 9 に記載の塩基配列を有するプローブであり、さらに、前記第 2 のプローブが配列表の配列番号 10 に記載の塩基配列を有するプローブであることを特徴とする請求項 3 ～ 5 のいずれか一項に記載の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

特定の遺伝子を発現した細胞を生きたままで選択的に分離する方法としては、当該遺伝子の翻訳産物が細胞表面分子である場合は、同表面分子に蛍光標識抗体を結合させフローサイトメーターにより蛍光を発する細胞を同定し、同定された細胞をセルソーター（Fluorescence Activated Cell Sorter、FACS）により分離する方法を挙げることができる。また、細胞表面分子に特異的に結合する抗体が敷き詰められたディッシュ底面上に目的細胞のみを吸着させるパニング法も知られている。

【0003】

一方、遺伝子の翻訳産物として細胞表面分子を生じることなく、翻訳産物が専ら細胞内（細胞質内もしくは諸器官内）に局在する分子である場合は、上記の方法を採用することができない。この場合は、細胞内に局在する分子に特異的な蛍

光標識抗体をマイクロインジェクション法により細胞内に導入して遺伝子発現細胞を蛍光標識し、レーザー光などの照射により生じた蛍光強度の格差に基づいて、上記のセルソーターにより目的遺伝子発現細胞を分離することは理論的には可能である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、マイクロインジェクションによる上記の細胞標識法は、1回の実験あたり1個ないしは数個の細胞に蛍光標識抗体を導入するのが実験手技上の限界であり、また、一度に多くを標識できる手法ではなく、分子量12万以上の高分子である抗体の高濃度溶液は粘性が高く細胞内への導入は容易ではないことから、実用化の観点で問題がある。

【0005】

また、遺伝子の翻訳産物が細胞表面分子ではなく、翻訳産物が細胞外液中に遊離され、細胞内や細胞膜付近に止まらないような分子である場合は、特定の遺伝子を発現した細胞を上記の手法で選択的に捕らえ、他の分子と分離することは非常に困難である。これは、遺伝情報に基づいて翻訳されて生じたポリペプチド鎖が折り畳まれて細胞外へ分泌される過程で、その構造は細胞内で時々刻々変化するため、既存の抗体では生細胞の細胞内もしくは細胞表面で効率よくこのポリペプチド鎖に結合できないからである。

【0006】

上記のような問題点が生じる典型的な例として、以下に述べる、遺伝子の翻訳産物としてサイトカインを分泌する細胞を選択的に分離する場合が挙げられる。

【0007】

生体内に抗原が侵入した場合、その抗原を異物として認識したヘルパーT細胞(CD4+T細胞)は活性化され、相互に免疫機能を異にするTH1(T Helper 1、マクロファージ等を活性化し異物を貪食させて排除するなど細胞性免疫機能を担当する)と、TH2(T Helper 2、B細胞を活性化し異物を中和する抗体分子の産生等を促すなど液体性免疫機能を担当する)とに分化する(図44参照)。TH1およびTH2は、サイトカインとしてそれぞれイン

ターロイキン-2 (IL-2) およびインターロイキン-4 (IL-4) を生じる。健常な状態では、TH1とTH2は相互に機能を抑制し、均衡を保っているが、この関係が破綻すれば、さまざまな感染症や自己免疫疾患の原因となる。

【0008】

TH1またはTH2を選択的に分離取得することができれば、免疫機能補充を目的とした機能細胞の生体移植等への応用をはかることができるため医学的な重要性が高い。しかしながら、IL-2を生じるTH1とIL-4を生じるTH2とを上記従来技術を用いて選択的に分離することは非常に困難である。これは、TH1とTH2を識別するための決定的な細胞表面抗原（マーカー）が存在せず、さらに、TH1およびTH2が産生するサイトカイン（IL-2およびIL-4）は細胞内や細胞膜付近に止まらず、細胞外液中に遊離してしまうからである。

【0009】

本発明は、上記の従来技術の問題点を鑑みてなされたものであり、細胞にマーカーとして使用可能な細胞表面分子が存在しない場合や、存在しても細胞間で区別ができない場合、さらにはマーカーとなるべき分子が細胞外液中に遊離してしまう場合であっても、目的とする細胞、すなわち特定の遺伝子を発現した細胞を生きたままの状態を選択的に分離取得することが可能な分離方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、上記従来技術の問題点は、特定の遺伝子の翻訳産物（ポリペプチド）を標的（マーカー）として用い、遺伝子発現細胞を分離しようとするために生じるものであることを見出した。そして、その知見に基づいて、翻訳産物（ポリペプチド）に代えて、遺伝子の転写産物であり、主として細胞質中に浮遊状態で存在するmRNAを標的（マーカー）として用いることにより、マーカーとして使用可能な細胞表面分子が存在しない場合や、存在しても細胞間で区別ができない場合、さらにはマーカーとなるべき分子が細胞外液中に遊離してしまう場合であっても、特定の遺伝子を発現した細胞を生きたまま

の状態を選択的に分離することが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法は、特定の mRNA を発現した生細胞を含む生細胞群の細胞中に、該 mRNA を標識可能な標識剤を導入する第 1 の工程と、前記標識剤で前記 mRNA を標識することにより、標識化 mRNA を含有する生細胞を含む生細胞群を得る第 2 の工程と、前記標識化 mRNA を検出することにより該標識化 mRNA を含有する生細胞を同定し、同定した該生細胞を前記第 2 の工程で得られた前記生細胞群から選択的に分離する第 3 の工程とを含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 2 】

本発明の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法においては、前記第 1 の工程における標識剤が、前記 mRNA と相補的な塩基配列を有し、且つ蛍光色素で標識されたプローブであり、前記第 2 の工程における標識化 mRNA が、該プローブと前記 mRNA とのハイブリッド体であり、前記第 3 の工程において、該ハイブリッド体を含有する生細胞を含む生細胞群に光を照射して、該ハイブリッド体の形成に基づく前記蛍光色素の蛍光変化を検出することにより該蛍光変化を生じる生細胞を同定し、同定された該生細胞を前記第 2 の工程で得られた前記生細胞群から選択的に分離することが好ましい。

【 0 0 1 3 】

また、前記プローブが、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブからなり、該第 1 のプローブと、該第 2 のプローブとは、前記 mRNA に対して隣接してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、該第 1 のプローブがエネルギードナー蛍光色素で標識され、そして該第 2 のプローブがエネルギーアクセプター蛍光色素で標識されたものであり、前記蛍光変化が、該第 1 のプローブのエネルギードナー蛍光色素から、該第 2 のプローブのエネルギーアクセプター蛍光色素への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) であることが好ましい。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法においては

、前記第3の工程における、前記蛍光変化を生じる生細胞の選択的分離が、セルソーター（FACS）により実施されることが好ましい。

【0015】

また、前記mRNAが、サイトカインをコードするmRNAであることが好ましく、さらには、前記mRNAが、インターロイキン-2（IL-2）をコードするmRNAであり、前記第1のプロープが配列表の配列番号9に記載の塩基配列を有するプロープであり、さらに、前記第2のプロープが配列表の配列番号10に記載の塩基配列を有するプロープであることが好ましい。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明の特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法は、特定のmRNAを発現した生細胞を含む生細胞群の細胞中に、該mRNAを標識可能な標識剤を導入する第1の工程と、前記標識剤で前記mRNAを標識することにより、標識化mRNAを含有する生細胞を含む生細胞群を得る第2の工程と、前記標識化mRNAを検出することにより該標識化mRNAを含有する生細胞を同定し、同定した該生細胞を前記第2の工程で得られた前記生細胞群から選択的に分離する第3の工程とを含む方法である。

【0017】

本発明において細胞中に導入する標識剤は、mRNAを標識できるものであればよく、特に制限されない。標識剤は細胞内でmRNAと結合することにより標識化mRNAが生じるが、細胞中にmRNAが存在しない場合や、mRNAが存在したとしても標識剤を過剰量導入したような場合は、mRNAとの結合に関与しない標識剤が細胞中に残存することが考えられるため、標識剤は、mRNAと結合したときのみに検出可能となるようなものであるか、もしくは、mRNAと結合したものとmRNAに結合しないものとを別々に検出できるようなものであることが好ましい。

【0018】

本発明においては、標識剤として、mRNAと相補的な塩基配列を有し、且つ蛍光色素で標識されたプロープ（以下、場合により蛍光標識プロープと呼ぶ）を

使用することが好ましい。このようなプローブは細胞内で mRNA とハイブリッド体を形成するが、上記のようにハイブリッド体を形成しないプローブと分離して検出する必要があるために、本プローブはハイブリッド体が形成されたことに基づいて蛍光変化を生じるようなものを用いることが好ましい。

【 0 0 1 9 】

このようなプローブとしては、それぞれ別種の蛍光色素で標識したプローブを組み合わせる用いることが好ましい。すなわち、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブからなるプローブであって、該第 1 のプローブと、該第 2 のプローブとは、前記 mRNA に対して隣接してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、該第 1 のプローブがエネルギードナー蛍光色素で標識され、そして該第 2 のプローブがエネルギーアクセプター蛍光色素で標識されたプローブを用いることが好ましい。

【 0 0 2 0 】

第 1 のプローブを標識するエネルギードナー蛍光色素と、第 2 のプローブを標識するエネルギーアクセプター蛍光色素とを、適当な距離（例えば 8 nm 以下）に接近させることにより、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）が可能となる。したがって、プローブにおけるそれぞれの蛍光色素の標識位置は、第 1 のプローブと第 2 のプローブと mRNA の 3 者がハイブリッド体を形成したときに、エネルギードナー蛍光色素とエネルギーアクセプター蛍光色素の間で FRET が生じる距離になるようにすることが好ましい。前記 2 種類の蛍光色素間の好適な距離は、蛍光色素の種類や、mRNA においてハイブリダイズする部位等により変化するが、一般的には、2 つの蛍光色素は 20 塩基以内の距離に位置することが好ましく、2 ～ 4 塩基以内の位置とすることがより好ましい。FRET を生じるプローブを設計する場合においては、例えば、Lakowicz, J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy" (1983), Plenum Press, New York を参照することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明において用いられるエネルギードナー蛍光色素としては、4, 4-ジフロロ-1, 3, 5, 7-テトラメチル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-イ

ンダセン-8-プロピオン酸 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-propionic acid) およびその誘導体 (これらはBodipy 493/503シリーズとしてモレキュラープローブス社から入手可能) ; テトラメチルローダミンイソチオシアネート (5-イソチオシアネートおよび6-イソチオシアネートの混合物であってもよい) (tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate) およびその誘導体 (これらはTRITCシリーズとしてモレキュラープローブス社から入手可能) ; 及び4,4-ジフロロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザー-s-インダセン-3-プロピオン酸 (4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid) およびその誘導体 (これらはBodipy FLシリーズとしてモレキュラープローブス社から入手可能) が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明において用いられるエネルギーアクセプター蛍光色素としては、1,1'-ビス(ε-カルボキシペンチル)-3,3,3',3'-テトラメチル インドジカルボシアニン-5,5'-ニスルホン酸カリウム塩 (1,1'-bis(ε-carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethyl indodicarbocyanine-5,5'-disulfonate potassium salt) およびその誘導体 (これらはCy 5 シリーズとしてアマシヤム ファルマシア バイオテック社から入手可能) ; 1,1'-ビス(ε-カルボキシペンチル)-3,3,3',3'-テトラメチル インドカルボシアニン-5,5'-ニスルホン酸カリウム塩 (1,1'-bis(ε-carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethyl indocarbocyanine-5,5'-disulfonate potassium salt) およびその誘導体 (これらはCy 3 シリーズとしてアマシヤム ファルマシア バイオテック社から入手可能) ; X-ローダミンイソチオシアネート (5-イソチオシアネートおよび6-イソチオシアネートの混合物であってもよい) (X-rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate) およびその誘導体 (これらはXRITCシリーズとしてモレキュラープローブス社から入手可能) ; 6-((4,4-ジフロロ-5-(2-チエニル)-4-ボラ-3a,4a-ジアザー-s-インダセン-3-イル) スチリロキシ) アセチル アミノヘキサノ酸 (6-(((4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-yl)styryloxy)acetyl)amino)hexanoic ac

id) およびその誘導体（これらはBodipy 630/650シリーズとしてモレキュラープローブ社から入手可能）；6 - (((4 , 4 - ジ フ ロ ロ - 5 - (2 - ピ ロ ー リ ル) - 4 - ボ ラ - 3 a , 4 a - ジ ア ザ - s - イ ン ダ セ ン - 3 - イ ル) ス チ リ ロ キ シ) ア セ チ ル) ア ミ ノ ヘ キ サ ン 酸 (6 - (((4 , 4 - d i f l u o r o - 5 - (2 - p y r r o l y l) - 4 - b o r a - 3 a , 4 a - d i a z a - s - i n d a c e n e - 3 - y l) s t y r y l o x y) a c e t y l) a m i n o h e x a n o i c a c i d) およびその誘導体（これらはBodipy 650/665シリーズとしてモレキュラープローブ社から入手可能）等が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

本発明においては、エネルギードナー蛍光色素としてはBodipy 493/503を用いることが好ましく、また、エネルギーアクセプター蛍光色素としてはCy 5またはXRITCを用いることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

本発明において、1本のプローブを構成するオリゴヌクレオチドの塩基数には特に厳しい制限はない。ただし、塩基数が極端に少ない場合、例えば10塩基未満である場合は、十分安定なハイブリッド体を形成することが困難になる傾向にある。また、プローブの塩基数が50塩基を超すほど多い場合には、プローブの合成が困難になるばかりか、プローブの安定性も低下し、ハイブリッド体形成に要する時間も長くなる傾向にある。

【 0 0 2 5 】

プローブの塩基数は、用いる生細胞中のmRNAの濃度やハイブリダイゼーション時の温度等のハイブリダイゼーションの条件を考慮して決定する。一般に、プローブとmRNAとで形成されるハイブリッド体の融点は、プローブの塩基数が増えるにつれ上昇する。例えば、プローブの塩基数が15程度である場合は、室温において十分に高い効率でハイブリッド体が形成される傾向にあるが、37℃においてはハイブリッド体の形成率は必ずしも高くない。したがって、37℃でハイブリッド体の検出を行うためには15塩基以上、好ましくは20塩基以上の長さを有するプローブを使用することが望ましい

【 0 0 2 6 】

ただし、塩基数が多くなるほどmRNAとハイブリッド体を形成する速度が小

さくなる傾向は、プローブの塩基数が15～20の範囲でも同様である。例えば、室温において、20塩基のプローブとmRNAのハイブリダイゼーションが終了するために必要な時間は、15塩基のプローブを用いる場合に比べて数倍長い。これらの要件を総合的に判断すれば、使用するプローブの塩基数は、10～50塩基であることが好ましく、15～20塩基であることがさらに好ましい。

【0027】

プローブを設計する場合においては、上述したようにプローブの塩基数が重要となるが、これに加えて、プローブがmRNAのどの位置でハイブリダイズするかも重要となる。すなわち、一般に、mRNAはそれ自体が複雑な立体構造をとっている分子であるため、用いるプローブがmRNAのある部位と相補的な塩基配列を有していても、その部位が分子内の他の部位と相互作用する場合には立体構造的にハイブリダイゼーションに障害が生じることがある。したがって、本発明において、プローブがハイブリダイズするmRNAの部位を適宜選択することが好ましい。

【0028】

ハイブリダイズする部位は、例えば以下に述べるような手法により決定することができる。まず、目的のmRNAの塩基配列をデータベース等から入手する。データベースが利用できない場合は公知の方法によりmRNAの塩基配列を決定する。そして、その情報をもとにmRNAの2次構造をシミュレーションする。これは、例えば、DNAsis（日立ソフトエンジニアリング株式会社製）等のRNAの2次構造予測用の市販のコンピュータプログラムを使用することにより可能である。得られた2次構造図を用いて立体構造的に障害のない部分を中心に、適当な数の塩基配列を選択し、その塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを蛍光標識してプローブとして用いる。

【0029】

コンピュータプログラムにより得られた2次構造図をもとに、FRETを生じうる一組のプローブを設計する場合においては、mRNAの立体構造的に障害のない部分を中心として、例えば、30～40塩基の部位を数箇所選択し、それぞれの部位をさらに2つに分割し（各15～20塩基）、2分割された部位のそれ

ぞれに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを蛍光標識して第1のプローブおよび第2のプローブとして用いることが好ましい。

【0030】

このようにして合成した数組のプローブの中から最適なプローブの組を選別するためには、例えば、以下のような方法を用いることができる。すなわち、上記の方法により合成した第1のプローブと第2のプローブの混合溶液を調製して蛍光スペクトルを測定する。次いで、目的のmRNAをこの混合溶液に添加して、蛍光スペクトルの変化を観察する。第1のプローブ、第2のプローブおよびmRNAでハイブリッド体が形成されれば2種類の蛍光色素間でFRETが生じ、その結果、エネルギードナー色素の蛍光強度が減少し、エネルギーアクセプター色素の蛍光強度が増大した蛍光スペクトルが得られる。次に、第1のプローブと第2のプローブの何種類かの組について上記の作業を行い、蛍光スペクトルの変化量を比較して、変化量が大きいプローブの組を選択する。なお、上記の測定に使用するmRNAは、対応するcDNAを組み込んだプラスミドDNAを用いてインビトロ転写反応により合成することが可能である。

【0031】

また、mRNAへのハイブリダイゼーションの効率を正確に評価するためには、それぞれのプローブとmRNAとを水溶液中で混合し反応させた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等により、ハイブリッド体と遊離したままのプローブを分離し、ハイブリッド体を構成するプローブのプローブ全体に対する比率を求めることが可能である。

【0032】

以上、蛍光標識プローブの最適化について詳述したが、上述したように蛍光標識プローブは本発明において用いられる標識剤の好ましい一形態である。本発明においては標識剤を調製した後に、これを特定のmRNAを発現した生細胞中に導入する。標識剤を生細胞中に導入する方法に関しては特に制限はなく、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法など公知の方法が適用可能である。本発明においては、一度に100万個以上の生きた細胞に短時間で標識剤を導入する方法である、エレクトロポレーション法を用い

ることが好ましい。

【0033】

標識剤を生細胞に導入した後は、細胞中において当該標識剤により mRNA を標識する。標識剤として蛍光標識プローブを用いた場合においては、当該プローブと mRNA をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションを行う条件は特に制限されないが、例えば、蛍光標識プローブを導入した生細胞を室温にて数分間保持すればよい。

【0034】

細胞内で mRNA を標識した後は、標識化 mRNA を検出することにより、該標識化 mRNA を含有する生細胞を同定し、同定した該細胞を選択的に分離する。本発明において、標識化 mRNA を検出する方法には特に制限はない。ただし、標識剤を導入した生細胞群はその全てが mRNA を発現しているとは限らず、また、mRNA が存在したとしても標識剤を過剰量導入したような場合は、mRNA と結合していない標識剤が細胞中に残存するため、検出時においては、標識化 mRNA と、mRNA と結合していない遊離の標識剤とを、分離して検出することが必要である。

【0035】

標識化 mRNA と、mRNA と結合していない遊離の標識剤とを、簡単且つ高感度に分離して検出する方法としては、エネルギードナー色素で標識された第 1 のプローブと、エネルギーアクセプター色素で標識された第 2 のプローブを組み合わせる方法が好ましい。すなわち、これらのプローブを生細胞中に導入し、プローブと mRNA がハイブリダイズする条件で生細胞を保持した後に、第 1 のプローブのエネルギードナー蛍光色素の励起光を生細胞群に照射し、FRET に基づく第 2 のプローブのエネルギーアクセプター蛍光色素からの蛍光を観測することにより、簡単且つ高感度に分離検出が可能である。

【0036】

励起光の照射によって、mRNA とハイブリダイズしている第 1 のプローブのエネルギードナー色素も、mRNA とハイブリダイズしていない第 1 のプローブのエネルギードナー色素も同時に励起されるが、第 1 のプローブに隣接して第 2

プローブがハイブリダイズしている場合にのみ FRET が生じ、このときは第 2 のプローブのエネルギーアクセプター蛍光色素から蛍光が生じる。すなわち、エネルギーアクセプター蛍光色素からの蛍光が観察されたときは、第 1 のプローブと第 2 のプローブが隣接していることを意味するから、生細胞中で mRNA が標識化されたこと、すなわち、生細胞中に mRNA が発現していることがわかる。

【 0 0 3 7 】

このようにして検出された特定の mRNA を発現した生細胞は選択的に分離されるが、この分離方法に関しては特に制限はない。本発明において、蛍光標識プローブを用いる場合においては、セルソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter、FACS) を用いて、特定の mRNA を発現している生細胞を検出するとともに、選択的に分離することが好ましい。

【 0 0 3 8 】

セルソーターは、フローサイトメーターと細胞分取装置とを備えたものであり、特定物質を蛍光標識プローブで染色した個々の細胞に、細い流路の途中でレーザー光を照射することにより、散乱光 (前方散乱光や側方散乱光) や蛍光のシグナル情報を個々の細胞ごとに測定し、その結果を、例えば度数分布 (ドットプロット) として表示する機能を有しており、特定のシグナル情報を発する細胞にゲートをかけ所望の細胞を分取することができる。なお、以上のような方法はフローサイトメトリーと呼ばれている。

【 0 0 3 9 】

本発明において、FRET を生じうる蛍光標識プローブを用いてセルソーターにより特定の mRNA を発現した生細胞を選択的に分離する場合においては、例えば以下に述べる方法を適用することができる。すなわち、セルソーターにより個々の生細胞における、エネルギードナー蛍光色素 (例えば、Bodipy 493/503) を励起するレーザーを照射したときの同蛍光色素の相対的蛍光強度、および FRET に基づくエネルギーアクセプター蛍光色素 (例えば、Cy 5) の相対的蛍光強度のシグナル情報を得て、例えば、前者を横軸、後者を縦軸としてドットプロットを行い、後者が高い値をとる細胞群を選択しゲートをかける (このゲートの条件を R2 とする)。さらに、測定対象の生細胞の細胞サイズに基づく前方散乱光

と、生細胞の内部構造の複雑さに基づく側方散乱光のシグナル情報を得て、例えば、前者を横軸、後者を縦軸としてドットプロットを行い、測定対象の生細胞を表わしていると考えられる領域を選択しゲートをかける（このゲートの条件をR1とする）。そして、R1およびR2のいずれの条件も満たしている生細胞のみを分取できるようにセルソーターをセッティングすることにより、特定のmRNAが発現した細胞のみを選択的に分離することができる。

【0040】

以上で説明した方法により、様々な種類の生細胞が選択的分離の対象となる。また、様々な種類のmRNAが対象となる。抗原を異物として認識し活性化されたヘルパーT細胞から派生するTH1とTH2は、識別のための決定的な細胞表面抗原（マーカー）が存在せず、さらに、TH1およびTH2が産生するサイトカイン（IL-2およびIL-4）は細胞内や細胞膜付近に止まらず、細胞外液中に遊離してしまうため、TH1またはTH2は、本発明の選択的分離方法の適用対象として最適である。すなわち、本発明の選択的分離方法は、サイトカインをコードするmRNAを保有する生細胞を含む生細胞群を対象とすることが好ましい。

【0041】

なかでも、インターロイキン-2（IL-2）をコードするmRNAを保有する生細胞を含む生細胞群を対象とし、配列表の配列番号9に記載の塩基配列を有しエネルギードナー蛍光色素で標識された第1のプローブと、配列表の配列番号10に記載の塩基配列を有しエネルギーアクセプター蛍光色素で標識された第2のプローブを用い、これらのプローブのFRETを利用して選択的分離を行うことが好ましい。

【0042】

配列表の配列番号9に記載の塩基配列は、IL-2を生じるmRNAの塩基配列における342～356番目の塩基配列に相補的であり、配列表の配列番号10に記載の塩基配列は、IL-2を生じるmRNAの塩基配列における357～371番目の塩基配列に相補的である。エネルギードナー蛍光色素で標識された第1のプローブと、エネルギーアクセプター蛍光色素で標識された第2のプローブ

ブを mRNA の上記の位置で隣接させることにより、FRET に伴う検出を非常に高感度に行うことができる。

【0043】

【実施例】

以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0044】

(1) IL-2 mRNA と相補的なオリゴヌクレオチドの蛍光色素標識体の調製

IL-2 mRNA の全塩基配列から任意に30塩基の連続した配列を5箇所選び、これらと相補的な配列を有し、Bodipy493/503 (エネルギードナー蛍光色素)、Cy5 (エネルギーアクセプター蛍光色素)、もしくはXRITC (エネルギーアクセプター蛍光色素) で蛍光標識されたオリゴDNAプローブ (15mer) を設計した。

【0045】

DNA/RNA シンセサイザー (Perkin Elmer: Model 394 もしくは Perceptive: Model 18909) を用いて、 β シアノエチルアミダイト法により、設計したプローブの核酸合成を行った。なお、IL-2 mRNA の全塩基配列とオリゴDNAプローブの塩基配列を図1に示す。また、設計した10種類のオリゴDNAプローブの塩基配列 (配列番号1~10) と、該オリゴDNAプローブがハイブリダイズするIL-2 mRNA の塩基番号 (ハイブリダイズ位置) を以下の表1に示す。

【0046】

【表 1】

配列番号	塩基配列	ハイブリダイズ 位置*
配列番号 1	5'-GTAAAACTTAAATGT-3'	228-242
配列番号 2	5'-GGCCTTCTTGGGCAT-3'	243-257
配列番号 3	5'-TTTGGGATTCTTGTA-3'	198-212
配列番号 4	5'-GAGCATCCTGGTGAG-3'	213-227
配列番号 5	5'-GCAAGACTTAGTGCA-3'	77-91
配列番号 6	5'-CTGTTTGTGACAAGT-3'	92-106
配列番号 7	5'-GGTTTGAGTTCTTCT-3'	287-301
配列番号 8	5'-AGCACTTCCTCCAGA-3'	302-316
配列番号 9	5'-CCTGGGTCTTAAGTG-3'	342-356
配列番号 10	5'-ATTGCTGATTAAGTC-3'	357-371

*：プローブがハイブリダイズする IL-2 mRNA の塩基番号を示す。

【0047】

なお、以下に述べる（４）においては、上記配列番号１～１０の塩基配列の５'末端をBodipy493/503で標識して得られたプローブを用い、（８）においては、上記配列番号１～１０の塩基配列を蛍光色素で標識せずにプローブとして用いた。（９）においては、上記配列番号１、３、５、７、９の５'末端をBodipy493/503で標識したプローブと、上記配列番号２、４、６、８、１０の３'末端から４－５塩基間にXRITCで標識したプローブを用いた。また、（１１）においては、上記配列番号１、３、５、７、９の５'末端をBodipy493/503で標識したプローブと、上記配列番号２、４、６、８、１０の３'末端から４－５塩基間にCy5で標識したプローブを用いた。また、Bodipy493/503、XRITC、Cy5による標識方法は、以下に述べる（a）～（c）の方法に従った。

【0048】

本発明においては、エネルギードナー蛍光色素で標識したオリゴDNAプローブをドナープローブと略称し、エネルギーアクセプター蛍光色素で標識したオリゴDNAプローブをアクセプタープローブと略称する場合がある。また、配列番

号1の塩基配列をエネルギードナー蛍光色素で標識したプローブは、配列番号1がIL-2 mRNAの228～242番目の塩基配列に相補的であることから、228-242(D)と表記する場合がある(Dはドナーを意味する)。また、配列番号2の塩基配列をエネルギーアクセプター蛍光色素で標識したプローブは、配列番号2がIL-2 mRNAの243～257番目の塩基配列に相補的であることから、243-257(A)と表記する場合がある(Aはアクセプターを意味する)。なお、蛍光色素で標識しない場合は、例えば、単に228-242と表記する。したがって、以下に述べる(9)および(11)においては、用いるプローブは以下の表2に示すプローブ名で表わすことができる。

【0049】

【表2】

配列番号	塩基配列	7'□-7'名
配列番号1	5'-GTAAAACTTAAATGT-3'	228-242(D)
配列番号2	5'-GGCCTTCTTGGGCAT-3'	243-257(A)
配列番号3	5'-TTTGGGATTCTTGTA-3'	198-212(D)
配列番号4	5'-GAGCATCCTGGTGAG-3'	213-227(A)
配列番号5	5'-GCAAGACTTAGTGCA-3'	77-91(D)
配列番号6	5'-CTGTTTGTGACAAGT-3'	92-106(A)
配列番号7	5'-GGTTTGAGTTCTTCT-3'	287-301(D)
配列番号8	5'-AGCACTTCCTCCAGA-3'	302-316(A)
配列番号9	5'-CCTGGGTCTTAAGTG-3'	342-356(D)
配列番号10	5'-ATTGCTGATTAAGTC-3'	357-371(A)

【0050】

(a) ドナープローブ (Bodipy493/503標識) の作製

2.5mgのNHSS(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt)を30 μ lの滅菌水に溶かしたものと、5mgのEDAC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)を50 μ lの滅菌水に溶かしたものと1mgのBodipy493/503プロピオン酸を50 μ lのDMFに溶かしたものを混合し、室温で30分間反応させた。

一方、5'末端アミノ化試薬 6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイトを用いて上記塩基配列を有するオリゴDNAの5'末端にヘキシルアミノ基が導入したもの(凍結乾燥品)を200 μ lの0.5 M $\text{Na}_2\text{HCO}_3/\text{NaH}_2\text{CO}_3$ 緩衝液(pH9.3)に溶解させた。

【0051】

これらを混合して遮光条件下で一晩反応させ、反応液をゲル濾過し、未反応の色素を除去した後、CAPCELL PACK18(資生堂、カラムサイズは6mm内径 \times 250mm全長)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(流速;1ml/分、カラム温度;40 $^{\circ}$ C、移動相組成;5 mM TEAA入りの CH_3CN の5%溶液Aと40%溶液Bを用意しBの比率を20分の間に30-80%の濃度勾配をかけた)により、260nmと493nmに吸収をもつ反応生成物を分取し、凍結乾燥した。

【0052】

(b) アクセプタープローブ(Cy5標識)の作製

1チューブ分のCy5色素(Amersham, Fluorolink Cat. No. PA25001)を100 μ lの滅菌水に溶解した。一方、Uni-Link AminoModifier(Clontech社製)を用いて上記塩基配列を有するオリゴDNAの3'末端から4と5塩基の間にヘキシルアミノ基を導入したもの(凍結乾燥品)を200 μ lの $\text{Na}_2\text{HCO}_3/\text{NaH}_2\text{CO}_3$ 緩衝液(0.5 M、pH9.3)に溶解させた。そして、これらを混合し、遮光して一晩反応させた。

反応液をゲル濾過し、未反応の色素を除去した後、CAPCELL PACK18(資生堂、カラムサイズは6mm内径 \times 250mm全長)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(流速;1ml/分、カラム温度;40 $^{\circ}$ C、移動相組成;5 mM TEAA入りの CH_3CN の5%溶液Aと40%溶液Bを用意しBの比率を20分の間に15-60%の濃度勾配をかけた)により、260nmに吸収をもつ成分を分取し、その吸収スペクトルを220-700nmの範囲で測定し、650-700nmにおけるCy5の最大吸収を確認後、凍結乾燥した。

【0053】

(c) アクセプタープローブ(XRITC標識)の作製

100 μ lのXRITC色素溶液(溶媒;100% DMSO、Perkin Elmer, ROX-NHS)を、(b)と同様にヘキシルアミノ基が導入された上記塩基配列を有するオリゴDNAと反応させた。反応生成物を逆相高速液体クロマトグラフィーにかけ、260nmに

吸収をもつ成分を分取し、その吸収スペクトルを220-650nmの範囲で測定し、550-600nmにおけるXRITCの最大吸収を確認後、凍結乾燥した。

【0054】

(2) ヒトIL-2 RNAの試験管内合成

ヒトIL-2 mRNAと同等の塩基配列を有するヒトIL-2 RNAを取得するために、ヒトIL-2 cDNAを有するプラスミドDNA、pTCGF-II (ATCC#39673) より制限酵素pst Iで切り出したIL-2 cDNA断片を、RNA合成用ベクターpBluescript KS(+)のpst I消化部位にT3プロモーター下流に同cDNAが位置するようにライゲーションキット(タカラ社製)を用いて連結した。得られた組換え体プラスミドを大腸菌JM109株のコンピテントセル(タカラ社製)に導入し、得られた同大腸菌の形質転換体を培養し、100 mlの同培養液からPlasmid Midi Kit (QIAGEN社製)を用いて46.2 μ gのプラスミドDNAを抽出・精製した。

【0055】

同組換え体プラスミドを制限酵素Sma I消化により線状化し、同プラスミド溶液中に存在する蛋白質をproteinase Kで分解後、フェノール/クロロホルムを用いて変性・除去した。この精製遺伝子断片(0.66 μ g)を鋳型として、RNAを構成する各塩基の組成をA:C:G:U=3.5:1.8:1.4:3.2としたT3 RNAポリメラーゼ溶液をインビトロ転写反応キット(Megascript T3 Kits、Ambion社製)を用いて調製し、37℃で6時間ポリメラーゼ反応を行い、ヒトIL-2 cDNAを鋳型としたヒトIL-2 RNAを合成した。反応終了後、DNase I (Megascript T3 Kits、Ambion社製)で鋳型DNAを分解し、転写反応溶液中の蛋白質をフェノール/クロロホルムを用いて変性・除去した。得られたRNA溶液に等容のイソプロパノールを加え、遠心(14k rpm、7分間)による沈殿物としてヒトIL-2 RNAを回収し、未反応の酵素反応基質である各ヌクレオチド等を除去した。70%エタノールで1回すすいだヒトIL-2 RNA沈殿物(139 μ g)をRNaseを含有しない水(Megascript T3 Kits、Ambion社製)で溶かし、5 μ g/ μ lのヒトIL-2 RNA溶液を調製し、以降のハイブリダイゼーション実験に使用した。

【0056】

(3) 蛍光標識プローブとヒトIL-2 RNAのハイブリダイゼーションによる蛍光ス

ペクトル変化

ドナープローブとアクセプタープローブが隣接してハイブリダイズすることにもなう蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく蛍光スペクトルの変化を測定するために、300 nM (終濃度) のBodipy493/503標識ドナープローブおよびXRITC標識アクセプタープローブの組とヒトIL-2 RNAとを混合し、100 μ lの1×SSC (150 mM 塩化ナトリウム, 17 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.0) 溶液とし、室温で15分間放置した後に蛍光スペクトルを測定した。ドナープローブとアクセプタープローブの組としては、228-242(D)と243-257(A)、198-212(D)と213-227(A)、77-91(D)と92-106(A)、287-301(D)と302-316(A)、342-356(D)と357-371(A)を用いた。また、対照として、300 nMの上記プローブ単独の蛍光スペクトルを同様に測定した。なお、蛍光スペクトル測定条件は以下の通りであった。

蛍光分光光度計 ; F4500 (日立)

励起波長 ; 480nm

蛍光測定波長 ; 500-750nm

温度 ; 室温

【 0 0 5 7 】

その結果、全てにおいてヒトIL-2 RNAを加えると、エネルギードナー蛍光色素を励起したときのドナー色素の蛍光強度はFRETにより減少し、エネルギーアクセプター色素の蛍光波長領域(650-700nm)に顕著な蛍光スペクトルの変化 (蛍光強度が増大) が認められた (図2~6)。図2、3、4、5、6には、それぞれ228-242(D)と243-257(A)の組、198-212(D)と213-227(A)の組、77-91(D)と92-106(A)の組、287-301(D)と302-316(A)の組、342-356(D)と357-371(A)の組を用いたときの蛍光スペクトルを示す。図2~6を比較することによりわかるように、蛍光スペクトルはプローブの各組の間で格差が見られ、342-356(D)と357-371(A)の組を用いたときが最も顕著であった。

【 0 0 5 8 】

(4) プローブとヒトIL-2 RNAとのHPLCによるハイブリダイゼーション効率の測定

上記配列番号1~10の塩基配列を有するオリゴDNAをBodipy493/503で標

識したドナープローブの各々3 pmolを、等モルの(3)で合成したヒトIL-2 RNAと混合し、10 μ lの1 \times SSC (150 mM 塩化ナトリウム, 17 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.0) 溶液とし、室温で15分間放置した。その後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、ヒトIL-2 RNAと上記プローブとからなるハイブリッド体を、遊離のプローブから保持時間の差異を利用して以下の条件で分離した(同条件下での保持時間は遊離のプローブが約4~5分、ハイブリッド体が7.5分前後である)。

カラム: TSKgel DEAE-NPR (東ソー、内径4.6mm \times 全長35mm)

カラム流速: 1ml/分

カラム温度: 25 $^{\circ}$ C

移動相: A液; 20 mM Tris-HCl (pH9.0)

移動相: B液; 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH9.0)

【0059】

上記A液に対するB液の比率について、10分の間に25-100% (0.125-0.5 M NaClに相当)の濃度勾配をかけ、溶出される成分について紫外吸収(260nm)による核酸を示すピークと励起波長475nm/蛍光測定波長515nmによる標識色素Bodipy493/503に関するピークの検出を同時に行い、検出された全蛍光ピーク面積の中でハイブリッド体のピーク面積が占める割合(%)を求め、ハイブリダイゼーション効率の指標とした。

【0060】

図7に342-356(D)を用いた場合のHPLCクロマトグラムを示し、図8に357-371(D)を用いた場合のHPLCクロマトグラムを示す。また、各プローブに関するハイブリッド体のピーク面積が占める割合(%)をまとめて表3に示す。

【0061】

【表 3】

プロブ名	塩基配列	ハイブリット体の割合(%)
228-242(D)	5'-GTAAAACTTAAATGT-3'	0.1
243-257(D)	5'-GGCCTTCTTGGGCAT-3'	17.5
198-212(D)	5'-TTTGGGATTCTTGTA-3'	15.7
213-227(D)	5'-GAGCATCCTGGTGAG-3'	25.2
77-91(D)	5'-GCAAGACTTAGTGCA-3'	0.5
92-106(D)	5'-CTGTTTGTGACAAGT-3'	18.3
287-301(D)	5'-GGTTTGAGTTCTTCT-3'	13.3
302-316(D)	5'-AGCACTTCCTCCAGA-3'	6.2
342-356(D)	5'-CCTGGGTCTTAAGTG-3'	22.8
357-371(D)	5'-ATTGCTGATTAAGTC-3'	27.3

【0062】

表3示した結果から、213-227(D)、342-356(D)、そして357-371(D)が個別で比較的効率よく標的RNAにハイブリダイズするプローブであることが判明した。(3)において、342-356(D)、357-371(A)はそれぞれドナープローブ、アクセプタープローブとしてハイブリダイゼーションの効率を司る蛍光スペクトル変化が最も顕著であったことから、(3)と(4)の両実験結果は整合性がとれていると考えられる。

【0063】

(5) ヒトT細胞白血病株細胞Jurkat E6-1におけるIL-2遺伝子発現の誘導

細胞密度が 1×10^6 /mlのJurkat E6-1細胞に0.5 mg/ml (終濃度) の抗CD3抗体 (イムノテック社製)、同濃度の抗CD28抗体 (イムノテック社製)、10 nM PMA (シグマ社製) を添加して3日間 (72時間) 37℃、5% 二酸化炭素存在下で培養した。

【0064】

(6) IL-2蛋白分子の産生量の測定

(5) のIL-2遺伝子発現誘導処理に依存して多くのIL-2分子が産生され培養上清中に放出されれば、その細胞内ではIL-2 mRNAが活発に合成されたものと判断

される。そこでIL-2遺伝子発現の確認のために、(5)の処理が施されたJurkat E6-1細胞(以下、場合によりIL-2発現誘導細胞と呼ぶ)の培養上清を採取し、上清中のIL-2 (pg/ml/ 10^7 cells)をヒトインターロイキン-2測定キットを利用した以下に述べるELISAサンドイッチ法により定量し、未処理細胞(以下、場合によりIL-2発現未誘導細胞と呼ぶ)の場合と比較した。

【0065】

抗ヒトIL-2モノクローナル抗体が固相化されている96ウェルプレート(抗体プレート)の使用するウェルを洗浄液で2回洗浄し、使用する各ウェルに150 μ lの緩衝液を加えた。各ウェルに50 μ lのスタンダードIL-2 (0-1,600 pg/ml、前記測定キットの付属品)および上記培養上清を加え、37℃で一晩インキュベートした。ウェル内の反応液を除去し、洗浄液で3回洗浄した。第一抗体(抗ヒトIL-2ウサギ血清)溶液を100 μ l/ウェルになるように加え、室温で2時間インキュベートした。次いで、ウェル内の抗体液を除去し、洗浄液で3回洗浄した。

【0066】

第二抗体(ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体)溶液を100 μ l/ウェルになるように加え、室温で2時間インキュベートした。ウェル内の抗体液を除去し、洗浄液で3回洗浄後、各ウェルを充分乾燥させた。ペルオキシダーゼ基質(オ-フェニレンジアミン)の0.015%過酸化水素水溶液を100 μ l/ウェルになるように加え、室温で10-20分間反応させた。反応停止液(1 N H_2SO_4)を100 μ l各ウェルに加え、反応を停止させ、各ウェルの492 nmにおける吸光度をマイクロプレート用吸光度計で測定した。スタンダードIL-2の吸光度値から作成される検量線を基に、培養上清中のIL-2を定量した。

【0067】

その結果、IL-2発現誘導細胞は 6157 ± 168 (pg/ml/ 10^7 cells)のIL-2分子が培養液中に検出されたのに対して、IL-2発現未誘導細胞の上清中のIL-2は検出限界以下(<0.1 pg/ml/ 10^7 cells)であった。

【0068】

(7) IL-2遺伝子発現量の測定

本実験には、スタンダードとしてIL-2 RNA、測定試料としてJurkat E6-1細胞

の全RNA、さらにIL-2 RNAもしくはmRNA検出用のプローブとしてIL-2リボプローブ（ジゴキシゲニン標識体）が実験材料として必要であったため、以下の（a）～（c）のようにしてこれらを取得した。

【0069】

（a）スタンダードIL-2 RNA

スタンダードIL-2 RNAは、（2）で合成されたヒトIL-2 RNA（1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を1×dilution buffer（RNase を含有しない滅菌蒸留水:20×SSC:ホルムアミド = 5:3:1）で（ 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍に）順次希釈された後に、同希釈RNA溶液を68℃で10分間加熱後急冷されたものをプロッティングに用いた。

【0070】

（b）Jurkat E6-1細胞の全RNA

Jurkat E6-1細胞の全RNAは、RNeasy Kit（QIAGEN社製）を利用して抽出した。

（5）の条件下で0、24、48、72、96時間IL-2発現誘導処理を施された細胞（ $0.8-1.2 \times 10^7$ 個）を1,500rpmで5分間の遠心により沈殿として回収し、10 μl の β メルカプトエタノールを加えた1,000 μl のホモジナイゼーションbufferに細胞を懸濁し、18-gaugeの注射針で吸引／噴出しを繰り返し、充分に変性させた。同ホモジネートに1,000 μl の70%エタノールを加え、RNA吸着用カラムに加え、4,000×gで5分間遠心し、さらに洗浄用bufferを加え、同様に遠心しカラムを洗浄した。

【0071】

カラムにRNase を含有しない滅菌蒸留水を加え、吸着RNAを溶出させた。その溶出RNA溶液に1/10倍容の4 Mの酢酸ナトリウムと1倍容のイソプロパノールを加え、RNAは15,000×gで15分間遠心し沈殿物として回収した。同RNAはRNase を含有しない滅菌蒸留水に溶解した後、等容の2×dilution buffer（RNase を含有しない滅菌蒸留水:20×SSC:ホルムアミド = 1:6:2）で希釈し、68℃で10分間加熱後急冷した。

【0072】

（c）ジゴキシゲニン（DIG）標識IL-2リボプローブ

DIG標識IL-2リボプローブは、DIG RNA Labeling Kit（Boehringer Mannheim社製）を利用して合成した。EcoRI消化により完全に線状化された10 μg のヒトIL-

2 cDNA組み換えプラスミド (pTCGF#2) DNAをフェノール/クロロホルム抽出による蛋白質変性除去後にエタノール沈殿により精製し、リボプローブ合成のための鋳型とした。同鋳型DNA (5 μ g) と1.8 mM ATP、0.9 mM CTP、0.7 mM GTP、1.1 mM UTP、0.58 mM UTP (DIG標識体) をT7 RNA ポリメラーゼ存在下で混和し、37℃で2時間インキュベートした後、DNase I溶液を加え10分間反応させ、鋳型DNAを破壊した。同反応溶液に1/10倍容の5 Mの酢酸ナトリウムと1倍容のイソプロパノールを加え、合成RNAは15,000 \times gで15分間遠心し沈殿物として回収した。同RNAはRNase を含有しない滅菌蒸留水に溶解した。

【0073】

(d) IL-2遺伝子発現量の測定

上記(a)～(c)で取得した材料を用いてIL-2遺伝子発現量を測定した。細胞全RNA試料溶液をスタンダードIL-2 RNA溶液とともにナイロン膜にドットし、5 \times SSCで2回洗った後、ナイロン膜上のRNAをUV-クロスリンカー (Biorad社製) により固定した。同ナイロン膜をPrehybridization buffer (5 \times SSC、5% SDS、50 mMリン酸ナトリウム (pH7.0)、50% ホルムアミド、2% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim社製)、1% N-ラウロイルサルコシネート (N-lauroyl sarcosinate)) とともにハイブリバッグ (井内社製、耐湯バッグL) に封入し、68℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った。

【0074】

終濃度100 ng/mlになるようにDIG標識IL-2リボプローブをPrehybridization bufferで希釈し、10分間煮沸後急冷し、ハイブリダイゼーション液とした。ハイブリパック内のプレハイブリダイゼーション液をハイブリダイゼーション液と交換し、68℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜を2 \times Washing solution (2 \times SSC、0.1% SDS) で各5分間2回洗った後、0.2 \times Washing solution (0.2 \times SSC、0.1% SDS) で68℃で各15分間2回洗った。Buffer I (100 mM マレイン酸、150 mM NaCl (pH7.5)) による1分間の洗いの後、ナイロン膜をBuffer II (Blocking Reagent (Boehringer Mannheim社製) をbuffer Iで1%溶液としたもの) で30分間ブロッキングを行った。

【0075】

DIG標識RNAハイブリッドの化学発光検出は、DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim社製) を使用して行った。アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体のBuffer II溶液 (150 mU/ml) でナイロン膜を室温で1時間処理後、Buffer Iで各15分間2回洗い、CSPD (disodium 3- (4-methoxyspiro [1,2-dioxetane-3,2'- (5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan] -4-yl) phenylphosphate) をBuffer III (0.1 M Tris, pH 9.7, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂) で希釈して得られた250 μ Mの基質溶液とともにバッグ (LIFETECHNOLOGIES社製、Photogene development folder) に封入した。標識RNAに基づき発せられたフォトン数をアルガス50 (浜松ホトニクス社製) で計測し、スタンダードIL-2 RNAのフォトン数から検量線を作成し、それを基にして細胞の全RNA中のIL-2 mRNAを定量した。得られたIL-2 mRNA量 (モル) と全RNA抽出に用いた細胞数から単一細胞あたり大体のIL-2 mRNA分子数を求めた (図9)。

【0076】

図9に示すように、0、24、48、72、96時間IL-2発現誘導処理を施された細胞の細胞内IL-2 mRNA分子数 ($\times 10^4$) は、 $<0.29 \times 10^{-4}$ 、 0.76 ± 0.17 、 1.11 ± 0.40 、 1.22 ± 0.67 、 1.20 ± 0.28 であり、72時間 (3日間) 処理された細胞において最もIL-2 mRNAが多く存在することが判明した。また、上記各時間処理した細胞の培養液中のIL-2含量 (pg/ml/ 10^7 cells) は順に <0.32 、 1032 ± 25 、 2433 ± 533 、 2688 ± 194 、 2531 ± 283 であることから、IL-2の遺伝子発現の活発化にともない、より多くのIL-2分子が分泌されることが示唆された。

【0077】

(8) 個々のプローブとIL-2遺伝子発現が誘導されたヒトT細胞白血病株細胞Jurkat E6-1細胞のIL-2 mRNAとの細胞内ハイブリダイゼーション

前記(5)と同様に抗CD3抗体、抗CD28抗体、PMAで3日間処理することによってIL-2遺伝子発現を誘導させたIL-2発現誘導細胞と、IL-2発現未誘導細胞について、細胞内のIL-2 mRNAと個々のIL-2プローブとのハイブリダイゼーションを以下のようなIST (In Situ Transcription) 法により検出した。

【0078】

各Jurkat E6-1細胞 (5×10^5 cells/ml) をPBS(-)で3回洗い、1 mlのPBS(-)で

懸濁し、12mmのカバーガラス (poly-L-lysineが底面にコート) 上にマウントし、単層細胞を調製した。0.5% Triton-X100溶液に細胞を90秒間室温で曝すことによって細胞膜に物質透過性を付与した。細胞を速やかにPBS(-)で洗い、10 μ M (最終濃度) の上記表1に示した配列番号1~10の塩基配列を有するプローブ (非色素標識体)、オリゴdT (デオキシチミジンオリゴヌクレオチド、非色素標識体) またはオリゴdA (デオキシアデニンオリゴヌクレオチド、非色素標識体) を添加し、1時間室温でインキュベートした。細胞を速やかにPBS(-)で洗い、4%パラホルムアルデヒド溶液で室温で15分間固定した。

【0079】

細胞を1×SSCで3回洗い、0.35 mMのDIG (ジゴキシゲニン) 標識dUTPを含む1 mM デオキシリボヌクレオチド溶液 (Boehringer Mannheim社製) を1 u/ μ lの逆転写酵素 (東洋紡社製) とともに細胞に加え、30℃で2時間インキュベートした。細胞を1×SSCで3回洗い、Blocking buffer (Blocking Reagent (Boehringer Mannheim社製) を1 (w/v) %になるようにマレイン酸緩衝液で溶解したもの) で室温で1時間処理した。細胞をマレイン酸緩衝液で3回洗い、FITC (Fluorescein-isothiocyanate) 標識抗DIG抗体 (Blocking bufferで1 μ g/mlになるように溶解したもの) を添加し、30分間室温でインキュベートした。カバーガラスをPBS(-)で3回洗い、蛍光顕微鏡観察し、1視野あたりの総蛍光強度 (相対値) を測定した。

【0080】

そのときに得られた蛍光顕微鏡写真を図10および11に示す。図10は、固定された状態のIL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞の細胞中の全てのmRNAとオリゴdTとの間で形成される複合体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真であり、オリゴdTの代わりにオリゴdAを細胞に添加した場合や、複合体を蛍光標識するのに必要なDIG標識dUTPと逆転写酵素の両者を添加しなかった場合の対照実験結果も示している。図11は、固定された状態のIL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞の細胞中のIL-2 mRNAと上記プローブ (非蛍光標識体) との間で形成されるハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。なお、図11においては、IL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞のそれぞれ

において、各プローブの蛍光像を2枚表示してある。また、蛍光強度と細胞数から、1細胞あたりの蛍光強度（平均値±SE）を算出し、オリゴdTを細胞に添加したときの蛍光強度を基準（100%）に各プローブによる値を規格化し、図12に示す。

【0081】

その結果、342-356および357-371が個別で最も効率良く細胞内IL-2 mRNAとハイブリダイズすることが示された。これらはIL-2 mRNA分子内の連続した30塩基配列に相補的であることから、それぞれがエネルギードナー蛍光色素、エネルギーアクセプター蛍光色素で標識されれば、細胞内ハイブリダイゼーションにともなうFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）に基づく蛍光を特異的に検出することが可能となることが示唆された。

【0082】

(9) ドナープローブ、アクセプタープローブとIL-2発現誘導細胞におけるIL-2 mRNAとの細胞内ハイブリダイゼーション (ISH法)

(8) のIST法による実験結果において、蛍光顕微鏡視野全体の細胞にほぼ均一にプローブが導入されていたことに着目し、このプローブ導入方法をドナーおよびアクセプターの蛍光標識プローブにも応用し、これらのプローブと細胞内IL-2 mRNAとのハイブリダイゼーションをFRETに基づく蛍光として測定し、各組のプローブについて比較検討した。この方法はIST法からヒントを得て発展させたことからISH (In Situ Hybridization) 法と呼ぶ。

【0083】

(8) で記した方法によって細胞膜表面に物質透過性を付与されたIL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞に、Bodipy493/503で標識したドナープローブおよびXRITC標識したアクセプタープローブの溶液を2 μ M（最終濃度）添加し、1時間室温でインキュベートした。ドナープローブとアクセプタープローブの組としては、228-242(D)と243-257(A)、198-212(D)と213-227(A)、77-91(D)と92-106(A)、287-301(D)と302-316(A)、342-356(D)と357-371(A)を用いた。蛍光標識プローブをPBS（-）で洗い除き、4%パラホルムアルデヒド溶液で15分間室温で細胞を固定した。カバーガラスをPBS（-）で3回洗って蛍光顕

微鏡観察を行い、細胞にA（エネルギーアクセプター色素）の励起光を照射したときに細胞から発せられるAの蛍光（以下、場合によりA/A像と呼ぶ）、細胞にD（エネルギードナー色素）の励起光を照射したときに細胞から発せられるDの蛍光（以下、場合によりD/D像と呼ぶ）、細胞にDの励起光を照射したときに蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）により細胞から発せられるAの蛍光（以下、場合によりD/A像と呼ぶ）を得た。この結果、342-356(D)をドナープローブ、357-371(A)をアクセプタープローブとしたときに最大レベルのFRETに基づく蛍光が検出された。この蛍光顕微鏡写真を図13に示す。なお、図13においては、IL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞のそれぞれにおいて、各プローブの組のA/A像、D/D像、D/A像を2枚表示してある。また、対照実験としてプローブを導入しなかった結果も示してある。

【0084】

次に、得られた蛍光像の1視野全体のD/A（D励起によるFRETに基づくAの蛍光）およびA/A（A励起によるAの蛍光）を測定し、これらの測定値と1視野あたりの細胞数から1細胞あたりの蛍光強度値（平均値±SE）を算出した。以上の計算結果から細胞内ハイブリダイゼーションの効率を求めるために、細胞内全体のアクセプタープローブに対するIL-2 mRNAとハイブリダイズしたプローブの割合 $\{ (1 \text{細胞あたりのD/A}) / (1 \text{細胞あたりのA/A}) \}$ を百分率に換算した。この $(D/A) / (A/A) (\%)$ を指標にプローブの各組を比較した結果を図14に示す。以上(8)、(9)の結果を総合すると、342-356(D)、357-371(A)は個別で、かつ連続して標的mRNAに細胞内でハイブリダイズすることが示唆された。

【0085】

(10) 生きたIL-2発現誘導細胞にドナープローブおよびアクセプタープローブを導入したときの細胞内ハイブリダイゼーション

(3)～(9)の結果を踏まえ、342-356(D)、357-371(A)を生細胞内のIL-2 mRNA検出に使用するプローブとして選定した。蛍光色素で標識されたこれらのプローブをIL-2遺伝子を発現する生きた細胞に導入し、FRETによる蛍光の変化を指標にハイブリダイゼーションを特異的に検出することを試みた。

【0086】

前記(5)と同様に抗CD3抗体、抗CD28抗体、PMAで3日間処理することによって得られたIL-2発現誘導細胞と、IL-2発現未誘導細胞を回収し、氷冷PBS(-)で2回洗った後、同PBS(-)で細胞密度が 1×10^7 cells/mlになるように懸濁した。0.9 mlの同細胞懸濁液を、エレクトロポレーション用キュベット内にいれ、5.4 nmol (最終濃度6.0 μ M) のBodipy493/503標識されたドナープローブ342-356(D)、および5.3 nmol (同終濃度5.86 μ M) のXRITC標識されたアクセプタープローブ357-371(A)を添加して250 V、975 μ Fで細胞にパルスをかけた。細胞懸濁液を70 μ mのセルストレイナー (Falcon) を通過させ、軽く遠心後、細胞をPBS(-)で再度懸濁した。さらに通過液を40 μ mのストレイナー (Falcon社製) を通し、通過液を遠心後、再度懸濁して多くの死細胞を巻き込んだデブリ等を可及的に除いた後に、蛍光顕微鏡で観察した。

【0087】

その結果を図15に示す。図15にはIL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞における、A/A像、D/D像、D/A像、および位相差顕微鏡観察による透過像が示されている。なお、図15においては、IL-2発現誘導細胞およびIL-2発現未誘導細胞のそれぞれにおいて、各プローブの組のA/A像、D/D像、D/A像、および位相差顕微鏡観察による透過像を2枚表示してある。IL-2発現誘導細胞においては、視野全体の細胞20~22個の中で1~3個の細胞に、ドナープローブおよびアクセプタープローブがIL-2 mRNAに対して隣接してハイブリダイズしたことに基づく、D/Aが検出された。一方、IL-2発現未誘導細胞にはこのようなFRETによる蛍光は全く検出されなかった。

【0088】

(11) フローサイトメトリーによるIL-2遺伝子を発現する細胞の選択的分離

IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞に、ドナープローブとアクセプタープローブを導入し、これらのプローブとIL-2 mRNAの生細胞内ハイブリダイゼーションに基づくFRETによる蛍光強度の格差を利用して、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞とを選択的に分離することを以下のように試みた。

【0089】

(9)と同様に調製したIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の細胞懸濁液をそれぞれ100対0、0対100、50対50、20対80%の割合で混合して得られた懸濁液0.9mlをエレクトロポレーション用キュベット内にいれ、16.2 nmol (最終濃度18.0 μ M) のBodipy493/503標識されたドナープローブ342-356(D)、および14.7 nmol (同終濃度16.4 μ M) のCy5標識されたアクセプタープローブ357-371(A)を添加して(9)と同じ条件でパルスをかけた。生細胞を集め、フローサイトメトリー用実験装置 (FACSCalibur、BECTON DICKINSON社製) に注入した。

【0090】

流路の一カ所で、細胞にエネルギードナー蛍光色素 (Bodipy493/503) の励起光を照射したときに、前記ハイブリダイゼーションに基づいてアクセプター (Cy5標識体) から発せられる相対的蛍光強度 (FL3-Height) をBodipy493/503による相対的蛍光強度 (FL1-Height) とともにドットプロットとして検出した。このプロットの中でFL3-Heightが高い値をとる細胞群をR2として選択し、取り囲んだ (ゲートをかけた)。一方、ヒトリンパ球系細胞としての細胞のサイズ (FSC-Height; 前方散乱光) ならびに内部構造の複雑さ (SSC-Height; 側方散乱光) を有する集団を参考値 (FACSCalibur Training Manual, BECTON DICKINSON社) に基づいて選択し (ゲートをかけ)、R1と定めた。

【0091】

以上により得られたドットプロットを図16~23に示す。なお、図16はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が100対0の場合のFSC-HeightおよびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図17は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。図18はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が0対100の場合のFSC-HeightおよびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図19は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。また、図20はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が50対50の場合のFSC-HeightおよびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図21は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。さらに、図22はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が20対80の場合のFSC-Height

およびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図23は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。

【0092】

前記R2の条件を満たし、かつR1の条件も満たす集団をセルソーティング機能（セルソーター）を利用して選択的に分取した。分取した細胞群を再びFACSCaliburに注入し、目的通りに蛍光標識された細胞群であることを確認するために同様のドットプロットとして検出した。得られたドットプロットを図24～29に示す。図24はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が100対0の場合のFSC-HeightおよびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図25は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。また、図26はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が50対50の場合のFSC-HeightおよびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図27は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。さらに、図28はIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が20対80の場合のFSC-HeightおよびSSC-Heightに基づくドットプロットを示し、図29は同様の混合比率の場合のFL1-HeightおよびFL3-Heightに基づくドットプロットを示す。

【0093】

図17、図21、図23を比較することにより、細胞懸濁液中のIL-2発現誘導細胞の割合を100から50、20%と減少させるのにもない、FL3-Heightが高くR2に属する細胞群のドットプロット全体の中で占める割合が減少することがわかった。これに対して、同じドナープローブおよびアクセプタープローブをIL-2発現未誘導細胞に導入しても、FL3-Heightの値が高い細胞群は全く認められなかった（図19）。また、セルソーティング機能によりソートアウト（選択的分離）した細胞の大多数はゲートR1ならびにR2の条件を満たす集団であることから、IL-2発現誘導細胞が十分なFRET蛍光を発する細胞群として分取されたことが確認された（図24～29参照）。

【0094】

（12）蛍光顕微鏡観察によるフローサイトメトリー前後の細胞群の比較

フローサイトメトリー前後の細胞の一部をガラス底ディッシュに移し、蛍光顕微鏡を用いて視野全体の細胞の中で、D/A、A/A、D/Dの蛍光を発する細胞の割合について調べた。

【 0 0 9 5 】

その結果を図30～36に示す。図30、32、34、36には、フローサイトメトリー前の細胞群における、IL-2 mRNAとドナープローブおよびアクセプタープローブの3者で形成されるハイブリッド体のFRETに基づくアクセプター色素の蛍光像（D/A像）、細胞中の全てのドナープローブの存在を示すドナー色素の励起によるドナー色素の蛍光像（D/D像）、アクセプタープローブの存在を示すアクセプター色素の励起によるアクセプター色素の蛍光像（A/A像）、および前記細胞群の位相差顕微鏡観察による透過像が示されている。図31、33、35はフローサイトメトリー後（セルソーティング機能によって選択的に分取された後）の、上記と同様の像が示されている。なお、図30～36においては、細胞の蛍光像と透過像間の位置合わせのために、一部の細胞を指し示す矢印が記載されている。

【 0 0 9 6 】

図30および31の細胞群は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞（いずれも生きた状態）を100対0の比率で混合したものであり、図32および33の細胞群は、これらの比率が50対50のものである。また、図34および35の細胞群は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞（いずれも生きた状態）を20対80の比率で混合したものであり、図36の細胞群はこれらの比率が0対100のものである。

図30において、位相差顕微鏡観察による透過像に20 cellsとの記載があることからわかるように、視野全体に20個の細胞が存在している。また、A/A像、D/A像およびD/D像に、それぞれ5 cells、4 cellsおよび7 cellsとの記載があることからわかるように、A/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はそれぞれ5、4、7個であることがわかる。

【 0 0 9 7 】

また、図32においては、20 cells、3 cells、1 cellsおよび10 cellsとの

記載があることからわかるように、視野全体の細胞は20個であり、このなかでA/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はそれぞれ3、1、10個である。同様に、図34において、36 cells、7 cells、1 cellsおよび20 cellsとの記載があることからわかるように、視野全体の細胞は36個であり、このなかでA/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はそれぞれ7、1、20個である。更に、IL-2発現誘導細胞を含まない図36においては、21 cells、2 cells、0 cellsおよび3 cellsとの記載があることからわかるように、視野全体の細胞は21個であり、このなかでA/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はそれぞれ2、0、3個である。

【0098】

以上のことから、IL-2発現誘導細胞の割合を100から50、20%と減少させるのにもとないフローサイトメトリー前にはハイブリダイゼーションに基づいてIL-2 mRNAが蛍光標識されている細胞（D/Aの蛍光を発する細胞）の視野全体の細胞に対する割合が減少することがわかった。

【0099】

図31は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞（いずれも生きた状態）を100対0の比率で混合したものに対してフローサイトメトリーによる選択的分離を行った後の像を示すものであるが、位相差顕微鏡観察による透過像に7 cellsとの記載があることからわかるように、視野全体に7個の細胞が存在している。また、A/A像、D/A像およびD/D像に、それぞれ7 cells、7 cellsおよび7 cellsとの記載があることからわかるように、A/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はいずれも7個であった。

【0100】

また、図33の全てにおいて6 cellsとの記載があることからわかるように、視野全体の細胞は6個であり、このなかでA/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はいずれも6個であった。同様に、図35の全てにおいて5 cellsとの記載があることからわかるように、視野全体の細胞は5個であり、このなかでA/A、D/A、D/Dの蛍光を発する細胞の個数はいずれも5個であった。

【0101】

図30と31、図32と33、図34と35を比較することにより、フローサイトメトリーのセルソーティング機能（セルソーター）によって、IL-2 mRNAが蛍光標識されている細胞のみを選択的に分離することが可能であることがわかった。

【0102】

(13) In situ Hybridization法によるフローサイトメトリー前後の細胞群の比較

フローサイトメトリー前後の細胞の一部を別のガラス底ディッシュに移し、4% パラホルムアルデヒド/PBS (pH7.4) で室温で30分間細胞を固定し、FISH (Fluorescent in situ Hybridization) 法により視野全体の細胞の中でIL-2 mRNAを保有する細胞 (IL-2 mRNA (+)) の割合を求めた。第一に、このFISH法ではハイブリダイゼーションに用いるリボプローブが細胞内に止まることに起因する高バックグラウンドを防ぐ目的で、(7) (c) で記した方法で合成され、精製された全長のIL-2リボプローブを次の方法で細かく断片化したものを実験に用いた。

【0103】

10 μ gのリボプローブを100 μ lのアルカリ変性用溶液 (42 mM NaHCO₃, 63 mM Na₂CO₃, 5 mM DTT) に溶かし、60℃で10~15分間インキュベートした後に、10 μ lの3 M 酢酸ナトリウムとともに350 μ lのエタノールを加え、リボプローブをエタノール沈殿させた。-20℃で30分間放置後、16 krpmで20分冷却遠心し、得られた沈殿を70% エタノールで沈殿を洗い、乾燥させた後、50 μ lのRNase を含有しない滅菌蒸留水で溶解し、アルカリ変性IL-2リボプローブ溶液とした。

【0104】

ディッシュ底面に固定された細胞をPBS (-) で3回洗い、0.1% Triton X-100/PBS溶液で室温にて5分間処理し細胞膜に物質透過性を付与した後にPBS (-) で3回洗い、0.2N HClで室温にて10分間処理した。単層細胞をPBS (-) で洗った後、1 μ g/ml Proteinase K/PBS溶液で5分間37℃でインキュベートした。単層細胞をPBS (-) で洗った後、4% パラホルムアルデヒド/PBS (pH7.4) で30分間再度固定した。2 mg/ml グリシン/PBSで2回洗い (15分/回)、50% 脱イオン済ホルムアミド/2×SSC溶液 (溶液A、後出) で30分間処理し、ハイブリダイゼーション溶

液 (50% 脱イオン処理済ホルムアミド、5×denhardt、2×SSC、アルカリ変性処理済IL-2リボプローブ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) を調製し、90℃で10分間熱変性処理後氷冷し、同溶液100 μl をディッシュに添加し、45℃で一晩反応させた。

【0105】

ハイブリダイゼーション後の単層細胞を溶液 Aで5分間45℃で洗い、続いて溶液 B (10 mM Tris·HCl (pH8.5), 500 mM NaCl) で2回洗い (5分/回)、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A/溶液 B (90℃10分間熱処理したもの) で37℃で20分間処理した。

溶液 A、溶液 C (50% 脱イオン処理済ホルムアミド/1×SSC) の順で45℃で各30分間、さらに溶液 Cで室温で20分間洗った。さらに、Buffer 1 (100 mM マレイン酸、150 mM NaCl (pH7.5)) で洗った (5分×2回) 後、Buffer 2 (1% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim社製) in Buffer 1) で室温で20分間ブロッキングを行った。

【0106】

Buffer 1で2回洗った後、FITC標識抗DIG抗体 (Fab、Buffer 2で100倍希釈したもの、蛋白質濃度にして $\sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を単層細胞に加え30分間以上インキュベートし、PBS (-)で3回洗浄後蛍光顕微鏡観察し、視野全体の細胞に対するIL-2 mRNAを保有する細胞の割合を求めた。

【0107】

図37および38は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が10対0である場合の蛍光顕微鏡写真であり、図37はフローサイトメトリー前、図38はフローサイトメトリー後を示す。また、図39は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が0対100である場合のフローサイトメトリー前の蛍光顕微鏡写真である。図40および41は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が50対50である場合の蛍光顕微鏡写真であり、図40はフローサイトメトリー前、図41はフローサイトメトリー後を示す。また、図42および43は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が20対80である場合の蛍光顕微鏡写真であり、図42はフローサイトメトリー前、図43はフローサイトメトリー後を示す。

【0108】

なお、図中に記載された数字は視野全体の細胞数あたりの蛍光を発する細胞の個数を示しており、例えば、図37の48/48は、視野を占める48細胞全てに蛍光が観察され、IL-2 mRNAが含まれることを示すのに対して、図39の0/32は、32個の細胞の中でIL-2 mRNAを保有する細胞が皆無であることを示す。また、図40の18/35は、35個の細胞中に18個のIL-2 mRNA保有細胞が検出されたことを示し、図42の8/39は、39個の細胞中に8個のIL-2 mRNA保有細胞が検出されたことを示すことから、図40においては50対50の比率で、図42においては20対80の比率でIL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞を混合したことがよく反映されている。一方、図38、図41、図43における数字はそれぞれ9/9、7/7、8/8であり、このことから、フローサイトメトリー前には多くても50%もしくは約20%しか存在しなかったIL-2 mRNA保有細胞はすべてフローサイトメトリー後に100%に濃縮されることが確認された。

【0109】

(14) 特定の遺伝子を発現する生細胞の蛍光強度の格差を利用した分離法

(11)～(13)の実験結果を整理し、IL-2 mRNAが蛍光標識されることに基づく蛍光強度の格差を利用した分離法の成績を以下の表4に示す。フローサイトメトリー前には多くても50%もしくは約20%しか存在しなかったIL-2 mRNA保有細胞は、この蛍光強度の格差を利用した分離法によって100%に濃縮された。すなわち、IL-2 mRNA保有細胞を含む生細胞群から100%の純度で当該IL-2 mRNA保有細胞が選択的に分離された。

【0110】

【表 4】

混合比率 (%)		フローサイトメトリー			
		前		後	
IL-2 発現誘導細胞	IL-2 発現未誘導細胞	FRET (D/A) 陽性細胞 (%)	IL-2 mRNA 保有細胞 (%)	FRET (D/A) 陽性細胞 (%)	IL-2 mRNA 保有細胞 (%)
100	0	20	100	100	100
0	100	0	0	—	—
50	50	5	51.4	100	100
20	80	2.8	20.5	100	100

【0 1 1 1】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、細胞にマーカーとして使用可能な細胞表面分子が存在しない場合や、存在しても細胞間で区別ができない場合、さらにはマーカーとなるべき分子が細胞外液中に遊離してしまう場合であっても、目的とする細胞、すなわち特定の遺伝子を発現した細胞を生きたままの状態を選択的に分離取得することが可能な分離方法を提供することが可能となる。

【0 1 1 2】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Laboratory of Molecular Biophotonics

<120> Method for selectively separating live cells
that have expressed a specific gene

<130> P99MB-016

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 1

gtaaaactta aatgt

15

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 2

ggccttcttg ggcat

15

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 3

tttgggattc ttgta

15

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 4

gagcatcctg gtgag

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 5

gcaagactta gtgca

15

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 6

ctgtttgtga caagt

15

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 7

ggtttgagtt cttct

15

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 8

agcacttcct ccaga

15

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 9

cctgggtcct aagtg

15

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 10

attgctgatt aagtc

15

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、IL-2 mRNAの全塩基配列と、オリゴDNAプローブの塩基配列を示す図である。

【図 2】

図 2 は、ドナープローブ228-242(D)およびアクセプタープローブ243-257(A)がIL-2 RNAに対して隣接してハイブリダイズして生じたハイブリッド体の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 3】

図 3 は、ドナープローブ198-212(D)およびアクセプタープローブ213-227(A)がIL-2 RNAに対して隣接してハイブリダイズして生じたハイブリッド体の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 4】

図 4 は、ドナープローブ77-91(D)およびアクセプタープローブ92-106(A)がIL-2 RNAに対して隣接してハイブリダイズして生じたハイブリッド体の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 5】

図 5 は、ドナープローブ287-301(D)およびアクセプタープローブ302-316(A)がIL-2 RNAに対して隣接してハイブリダイズして生じたハイブリッド体の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 6】

図 6 は、ドナープローブ 342-356 (D) およびアクセプタープローブ 357-371 (A) が IL-2 RNA に対して隣接してハイブリダイズして生じたハイブリッド体の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 7】

図 7 は、ドナープローブ 342-356 (D) と IL-2 RNA の混合物溶液を H P L C を用いて分離したときに得られた H P L C クロマトグラムを示す図である。

【図 8】

図 8 は、アクセプタープローブ 357-371 (D) と IL-2 RNA の混合物溶液を H P L C を用いて分離したときに得られた H P L C クロマトグラムを示す図である。

【図 9】

図 9 は、IL-2 の発現誘導処理にともなう Jurkat E6-1 細胞の IL-2 分泌量、細胞抽出液中の IL-2 mRNA を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真、細胞内 IL-2 mRNA の分子数を示す図である。

【図 1 0】

図 1 0 は、固定された状態の IL-2 発現誘導細胞および IL-2 発現未誘導細胞の細胞中に、オリゴヌクレオチド（オリゴ d T または オリゴ d A）を導入後、DIG 標識 d U T P および逆転写酵素を添加したもの、オリゴヌクレオチドを導入しなかったもの、いずれも導入もしくは添加しなかったものの蛍光顕微鏡写真である。

【図 1 1】

図 1 1 は、固定された状態の IL-2 発現誘導細胞および IL-2 発現未誘導細胞の細胞中の IL-2 mRNA と各種プローブ（非蛍光標識体）との間で形成されるハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 1 2】

図 1 2 は、固定された状態の IL-2 発現誘導細胞および IL-2 発現未誘導細胞の細胞中の IL-2 mRNA と各種プローブ（非蛍光標識体）との間で形成されるハイブリッド体を蛍光標識し、その蛍光強度を、前記細胞中の全ての mRNA とオリゴ d T との間で形成される複合体の蛍光標識化合物から発せられる蛍光強度値を基準に規格化した結果を示す図である。

【図 1 3】

図 1 3 は、固定された状態の IL-2 発現誘導細胞および IL-2 発現未誘導細胞の中の IL-2 mRNA と各ドナープローブおよびアクセプタープローブの 3 者で形成されるハイブリッド体のドナー蛍光色素を励起したときの、D/A 像、D/D 像、A/A 像を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図 1 4】

図 1 4 は、固定された状態の IL-2 発現誘導細胞および IL-2 発現未誘導細胞の細胞中の IL-2 mRNA と各ドナープローブおよびアクセプタープローブの 3 者で形成されるハイブリッド体のドナー蛍光色素を励起したときのアクセプター蛍光色素の蛍光を測光し、前記細胞中の全てのアクセプタープローブの存在を示すアクセプター蛍光色素を励起したときのアクセプター蛍光色素の蛍光の測定値を基準に規格化した結果を示す図である。

【図 1 5】

図 1 5 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞および IL-2 発現未誘導細胞の中の IL-2 mRNA と 342-356 (D) および 357-371 (A) の 3 者で形成されるハイブリッド体の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 1 6】

図 1 6 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 100 対 0 である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である (R 1 は測定対象の生細胞として選択された領域)。

【図 1 7】

図 1 7 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 100 対 0 である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRET に基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である (R 2 は FRET に基づく蛍光を発する細胞として選択された領域)。

【図 1 8】

図 1 8 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が0対100である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である。

【図 1 9】

図 1 9 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が0対100である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRETに基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である。

【図 2 0】

図 2 0 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が50対50である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である（R 1 は測定対象の生細胞として選択された領域）。

【図 2 1】

図 2 1 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が50対50である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRETに基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である（R 2 はFRETに基づく蛍光を発する細胞として選択された領域）。

【図 2 2】

図 2 2 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が20対80である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である（R 1 は測定対象の生細胞として選択された領域）。

【図 2 3】

図 2 3 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞の混合比率が20対80である細胞群に対してフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRETに基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である（R 2 はFRETに基づく

蛍光を発する細胞として選択された領域)。

【図 2 4】

図 2 4 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 100 対 0 である細胞群に対して、図 1 6 における R 1 のゲートおよび図 1 7 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群に対して再びフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である。

【図 2 5】

図 2 5 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 100 対 0 である細胞群に対して、図 1 6 における R 1 のゲートおよび図 1 7 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群に対して再びフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRET に基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である。

【図 2 6】

図 2 6 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 50 対 50 である細胞群に対して、図 2 0 における R 1 のゲートおよび図 2 1 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群に対して再びフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である。

【図 2 7】

図 2 7 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 50 対 50 である細胞群に対して、図 2 0 における R 1 のゲートおよび図 2 1 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群に対して再びフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRET に基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である。

【図 2 8】

図 2 8 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 20 対 80 である

細胞群に対して、図 2 2 における R 1 のゲートおよび図 2 3 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群に対して再びフローサイトメトリーを行った結果を、前方散乱光と側方散乱光を基にドットプロットした図である。

【図 2 9】

図 2 9 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞の混合比率が 20 対 80 である細胞群に対して、図 2 2 における R 1 のゲートおよび図 2 3 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群に対して再びフローサイトメトリーを行った結果を、エネルギードナー蛍光色素による相対的蛍光強度と、FRET に基づくエネルギーアクセプター蛍光色素の相対的蛍光強度を基にドットプロットした図である。

【図 3 0】

図 3 0 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 100 対 0 の比率で混合した細胞群のフローサイトメトリー前の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 1】

図 3 1 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 100 対 0 の比率で混合した細胞群に対して、図 1 6 における R 1 のゲートおよび図 1 7 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 2】

図 3 2 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 50 対 50 の比率で混合した細胞群のフローサイトメトリー前の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 3】

図 3 3 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 50 対 50 の比率で混合した細胞群に対して、図 2 0 における R 1 のゲートおよび図 2 1 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それに

より得られた細胞群の、D/A像、D/D像、A/A像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 4】

図 3 4 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 20 対 80 の比率で混合した細胞群のフローサイトメトリー前の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 5】

図 3 5 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 20 対 80 の比率で混合した細胞群に対して、図 2 2 における R 1 のゲートおよび図 2 3 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 6】

図 3 6 は、生きた状態の IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 0 対 100 の比率で混合した細胞群のフローサイトメトリー前の、D/A 像、D/D 像、A/A 像、および位相差顕微鏡観察による透過像を示す顕微鏡写真である。

【図 3 7】

図 3 7 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 100 対 0 の比率で混合したフローサイトメトリー前の細胞群を、ガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞の IL-2 mRNA と IL-2 リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 3 8】

図 3 8 は、IL-2 発現誘導細胞と IL-2 発現未誘導細胞を 100 対 0 の比率で混合した細胞群に対して、図 1 6 における R 1 のゲートおよび図 1 7 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群をガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞の IL-2 mRNA と IL-2 リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 3 9】

図 3 9 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞を0対100の比率で混合したフローサイトメトリー前の細胞群を、ガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞のIL-2 mRNAとIL-2リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 4 0】

図 4 0 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞を50対50の比率で混合したフローサイトメトリー前の細胞群を、ガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞のIL-2 mRNAとIL-2リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 4 1】

図 4 1 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞を50対50の比率で混合した細胞群に対して、図 2 0 における R 1 のゲートおよび図 2 1 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群をガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞のIL-2 mRNAとIL-2リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 4 2】

図 4 2 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞を20対80の比率で混合したフローサイトメトリー前の細胞群を、ガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞のIL-2 mRNAとIL-2リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 4 3】

図 4 3 は、IL-2発現誘導細胞とIL-2発現未誘導細胞を20対80の比率で混合した細胞群に対して、図 2 2 における R 1 のゲートおよび図 2 3 における R 2 のゲートをかけてフローサイトメトリーによる選択的分離を行い、それにより得られた細胞群をガラス底ディッシュに固定させ、固定された状態の細胞のIL-2 mRNAとIL-2リボプローブとの間でハイブリッド体を形成させ、該ハイブリッド体を蛍光検出した蛍光顕微鏡写真である。

【図 4 4】

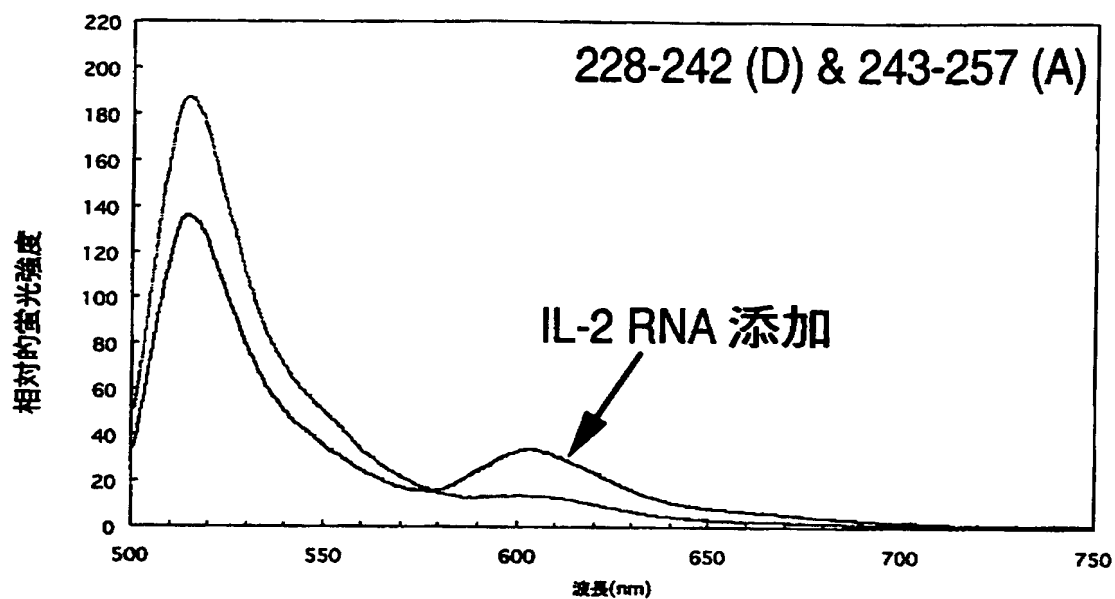
図 4 4 は、生体内免疫系を構成する各種細胞の細胞分化における相互関係と、インターロイキン（I L）等のサイトカインを介して各種細胞が協調もしくは牽制し合い、生体の免疫機能の恒常性が保たれることを示す図である。

【書類名】 図面

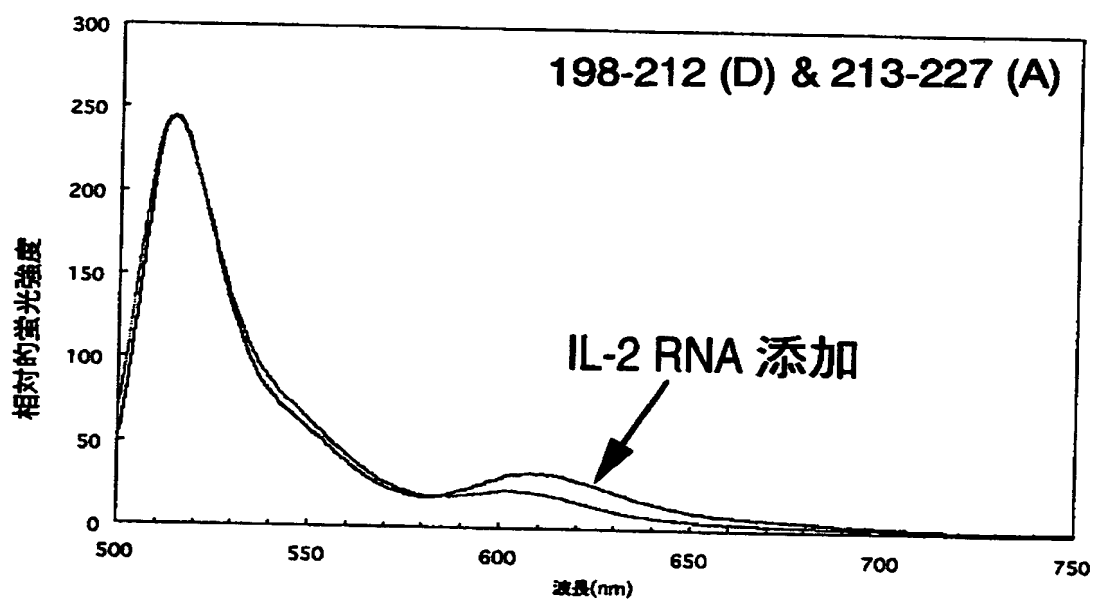
【図1】

10 20 30 40 50 60
 AUCACUCUCUUUAAUACACUACUCACAGUAAACCUCAACUCCUGCCACAAUGUACAGGAUGC
 70 80 90 100 110 120
 AACUCCUGUCUUGCAUUGCACUAAGUCUUGGCAUUGUCACAAACAGUGCACCUCUUCAA
ACCGATTCAGAACCTGAACAGTGTGTGTC
 77-91 92-106
 130 140 150 160 170 180
 GUUCUACAAAGAAAAACACAGCUACAACUGGAGCAUUUACUGCUGGAUUUACAGAUGAJUU
 190 200 210 220 230 240
 UGAAUGGAAUUAAUUACAAGAAUCCCAAAACUCACCAAGGAUGCUCACAUUUAAUUUU
ACCGATTCAGGCTTGAAGTGGTGCTACGAGTGAATATTCAAA
 198-212 213-227 228-242
 250 260 270 280 290 300
 ACAUGCCCAAGAAGGCCACAGAACUGAAACAUCUUCAGUGUCUAGAAGAAGAACUCAAAAC
GTACGGGTTCTTCCGG TCCTCTGAGCTTC
 243-257 287-301
 310 320 330 340 350 360
 CUCUGGAGGAAGUGCUAAAUUUAGCUCAAAGCAAAAACUUUCACUUAAGACCCAGGGACU
GAGACCTGCTTCACGA GTGAATCTCGGGTCCCTCA
 302-316 342-356
 370 380 390 400 410 420
 UAAUCAGCAAUAUCAACGUAUAGUUCUGGAACUAAAGGGAUCUGAAACAACAUAUCAUGU
ATTAGTCGTTA
 357-371
 430 440 450 460 470 480
 GUGAAUAUGCUGAUGAGACAGCAACCAUUGUAGAAUUUCUGAACAGAUUGGAUUACCUUUU
 490 500 510 520 530 540
 GUCAAAGCAUCAUCUCAACACUAAACUUGAUAAUUAAGUGCUUCCACUUA AAAACAUAUCA
 550 560 570 580 590 600
 GGCCUUCUAAUUUAAUUUAAAUUUUUAUUUUAJUGUUGAAJUGUAUGGUUUGCUA
 610 620 630 640 650 660
 CCUAUUGUAAACUAAUUAUUCUUAJUCUUA AAACUAAUUAUGGAUCUUUUUUGAUUCUUU
 670 680 690 700 710 720
 UUGUAAAGCCCUAGGGGCUUCUAAAUGGUUUCACUUAUUUAUCCCAAAAUAAUUUUAUUUA
 730 740 750 760 770 780
 UGUUGAAUGUUA AAUAUGUAUCUAUGUAGA UUGGUUAGUAAAACUAAUUUAAUAAAUUUG
 790 800
 AUAAAUAUAAAAAAAAAAC

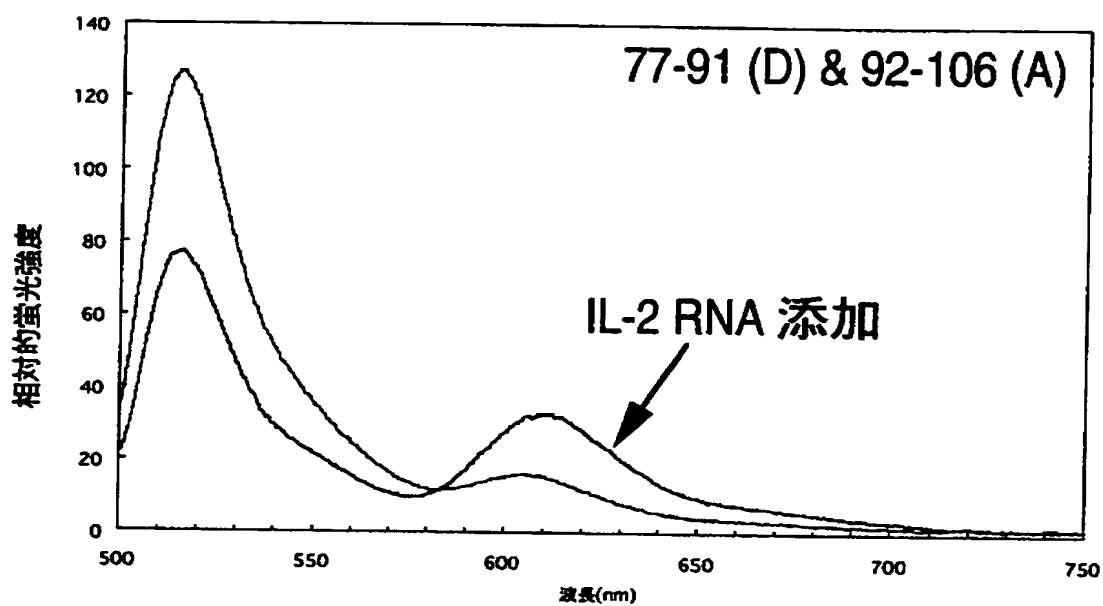
【図 2】



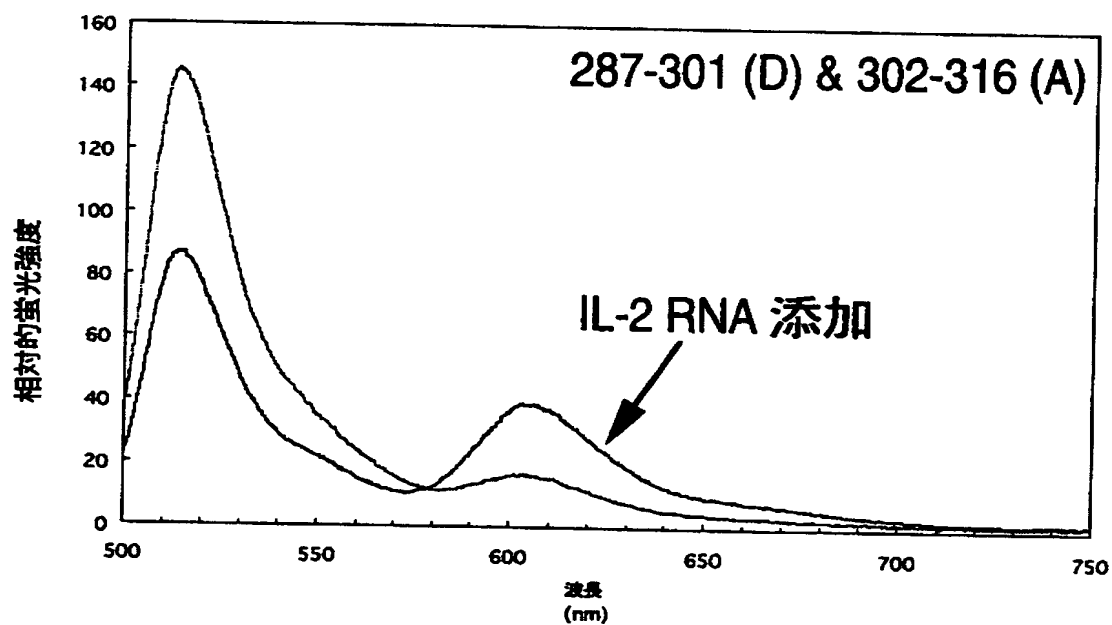
【図 3】



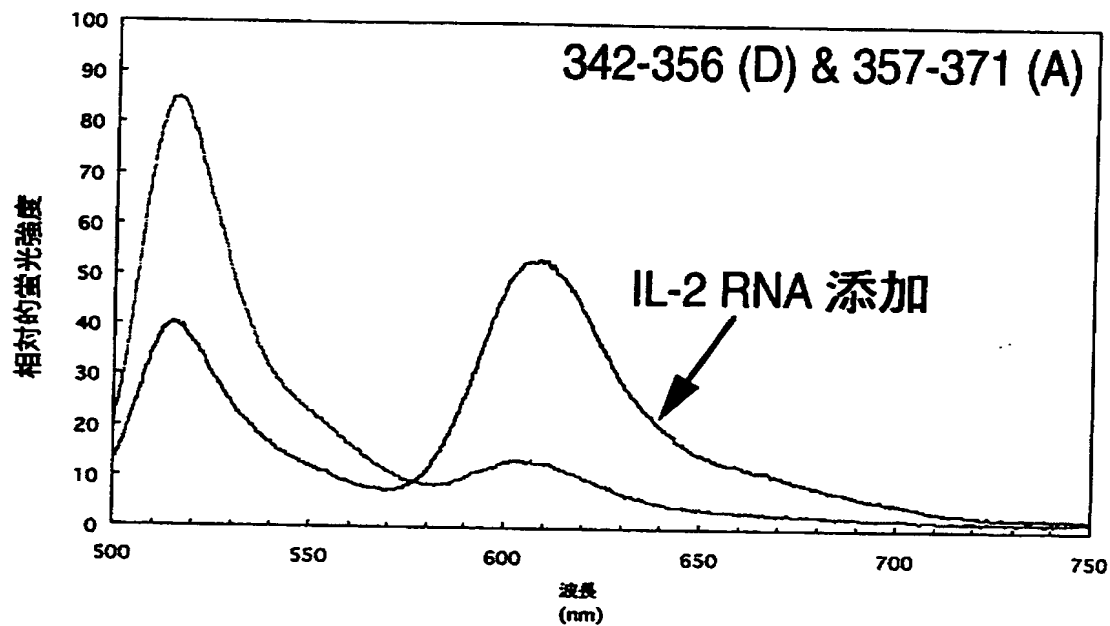
【图 4】



【图 5】

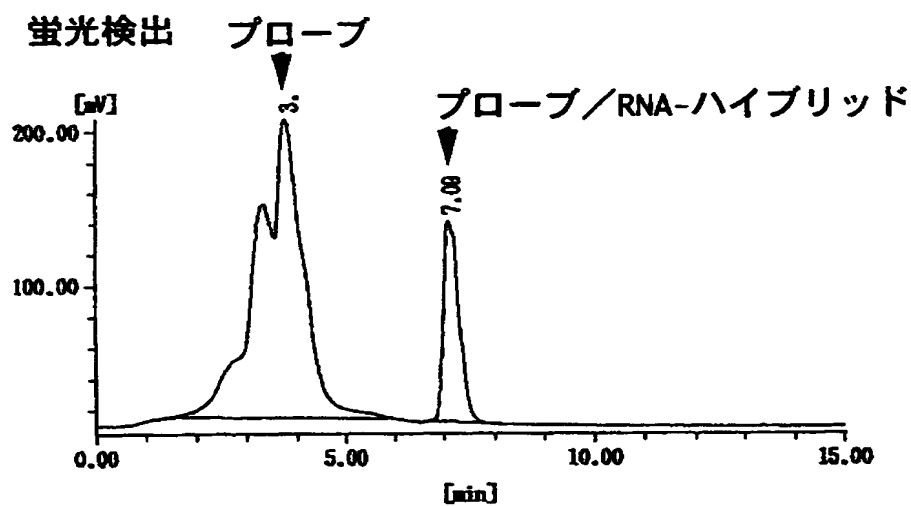


【図 6】



【図 7】

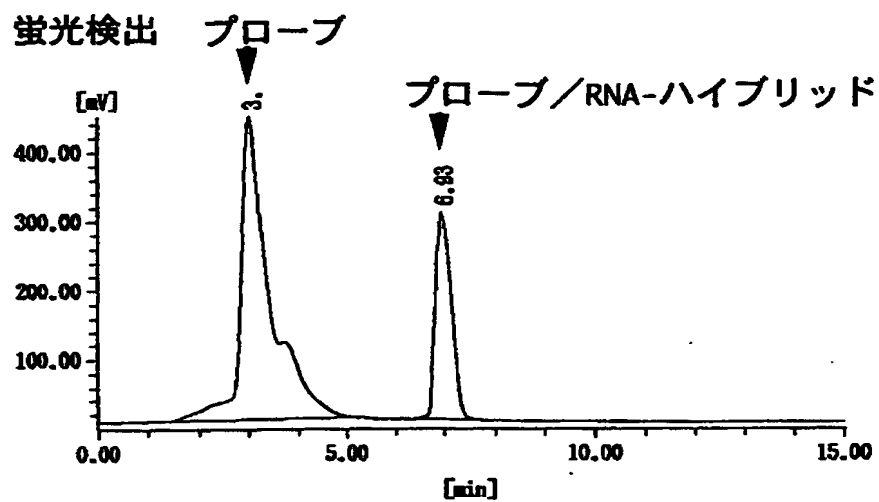
342-356 (D)



面積比 79.7% : 22.8%

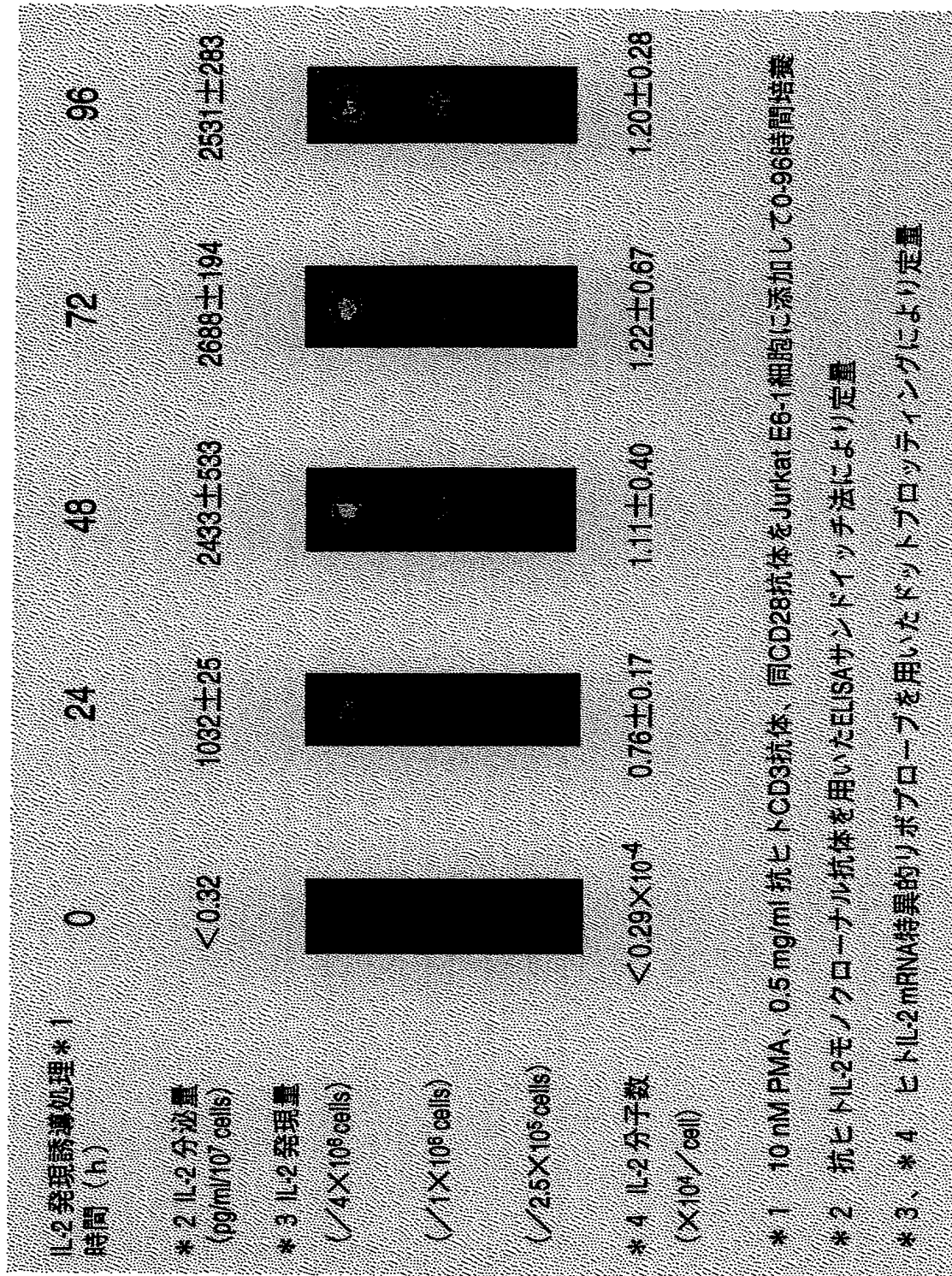
【図8】

357-371(D)



面積比 72.7% : 27.3%

【図9】



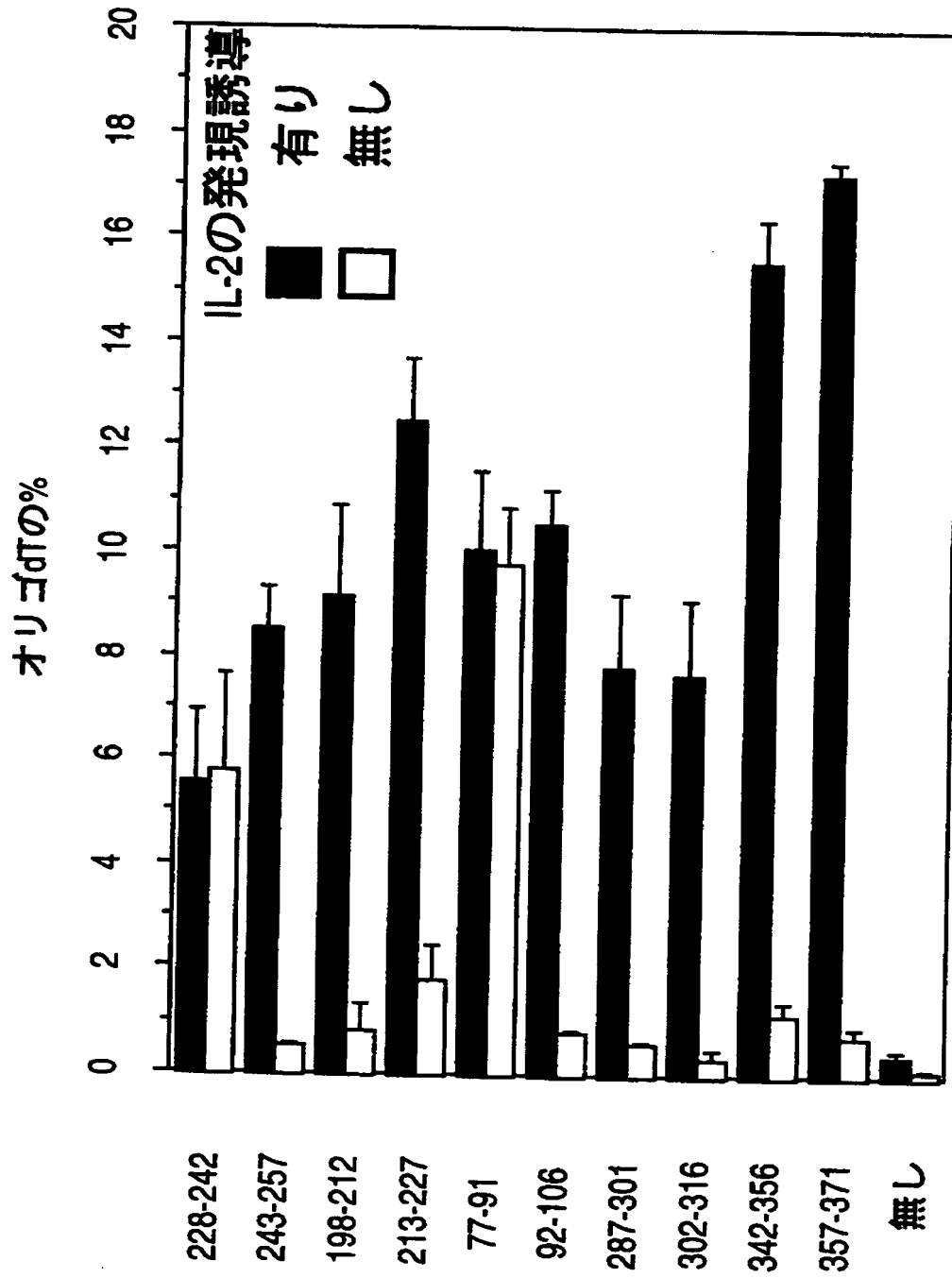
【図10】

DIG標識dUTP & 逆転写酵素	オリゴヌクレオチ ド	IL-2の発現誘導	
		有り	無
無添加	無添加		
添加	無添加		
添加	オリゴdA		
添加	オリゴdT		

【図 11】

プローブ	IL-2の発現誘導	
	有り	無し
228-242		
243-257		
198-212		
213-227		
77-91		
92-106		
287-301		
302-316		
342-356		
357-371		
無し		

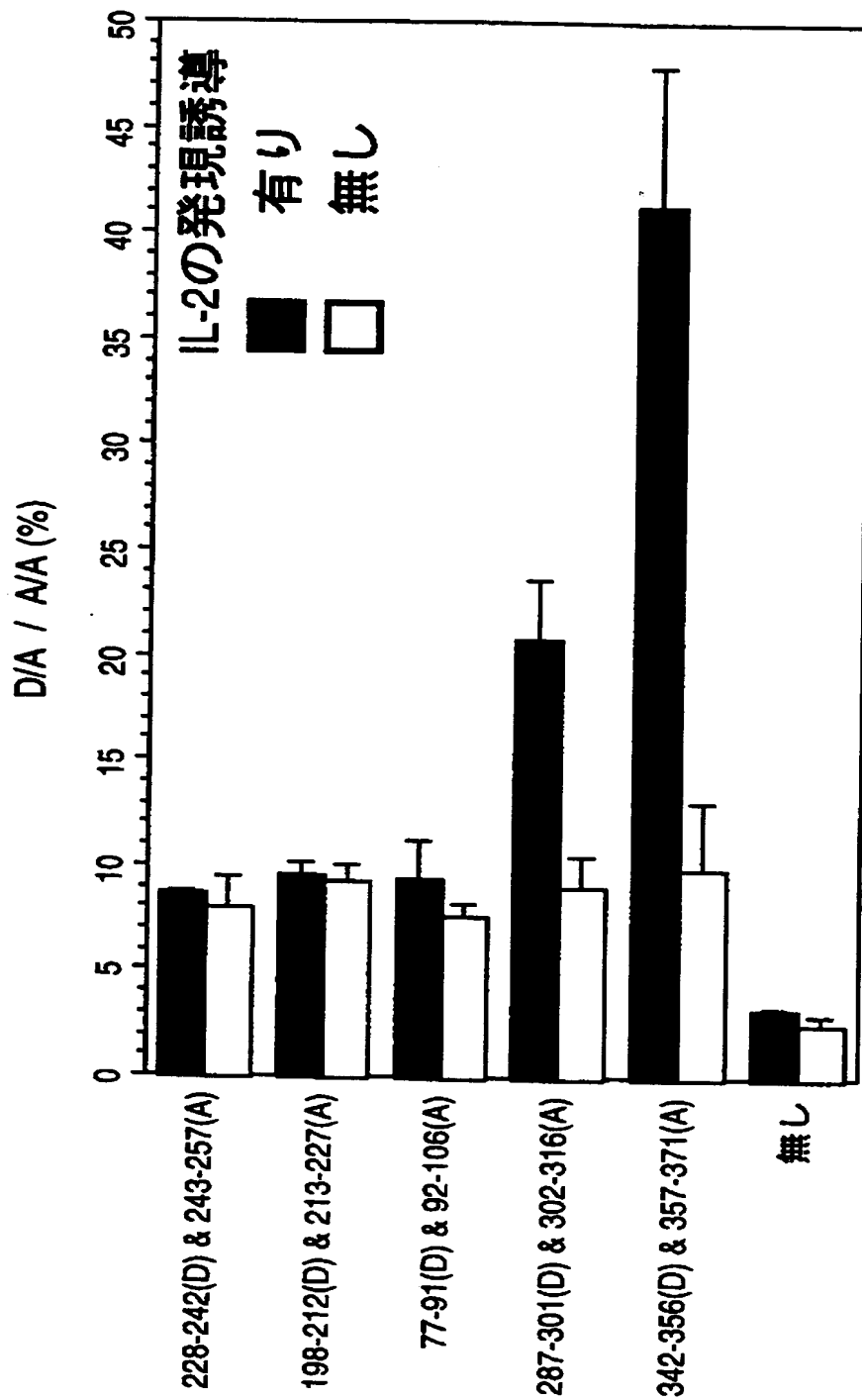
【図12】



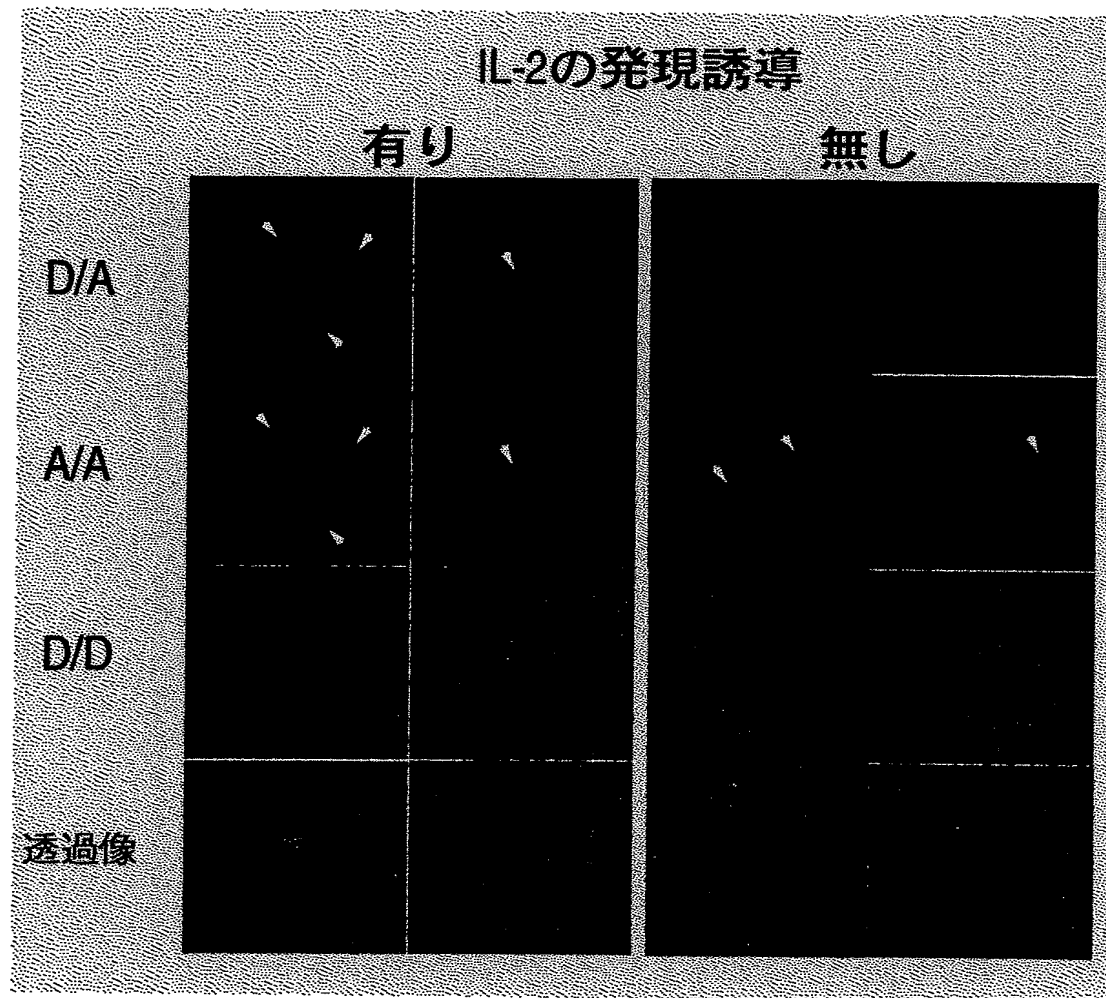
【図 13】

プローブ	IL-2の発現誘導					
	有り			無し		
	D/A	A/A	D/D	D/A	A/A	D/D
228-242(D) & 243-257(A)						
198-212(D) & 213-227(A)						
77-91(D) & 92-106(A)						
287-301(D) & 302-316(A)						
342-356(D) & 357-371(A)						
無し & 無し						

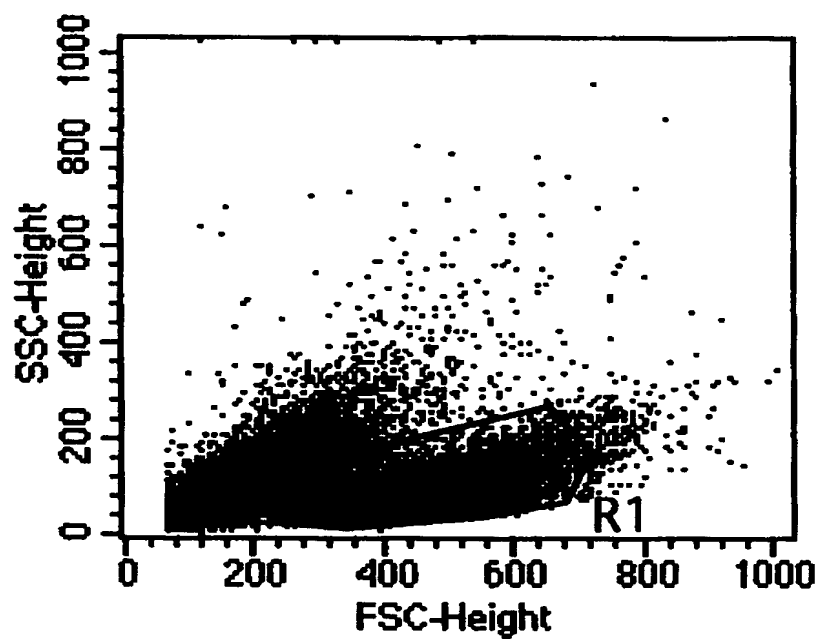
【図 14】



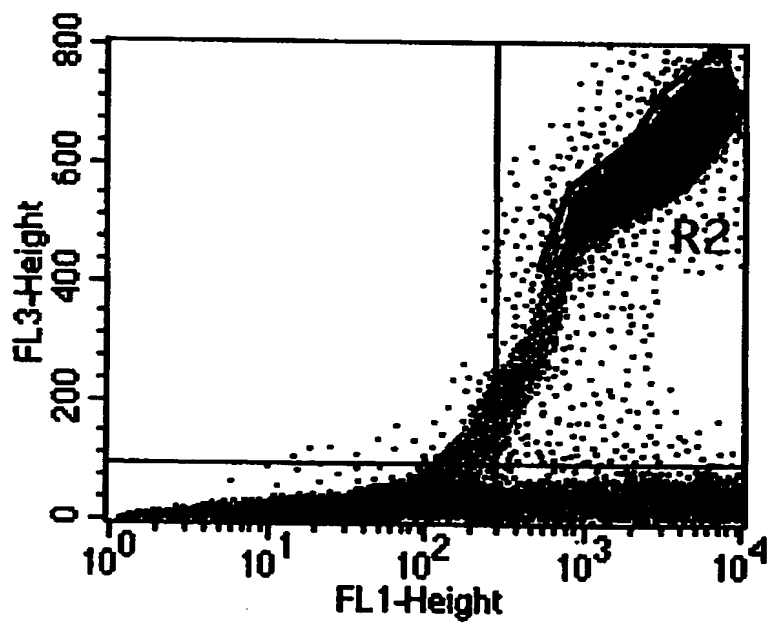
【図 1 5】



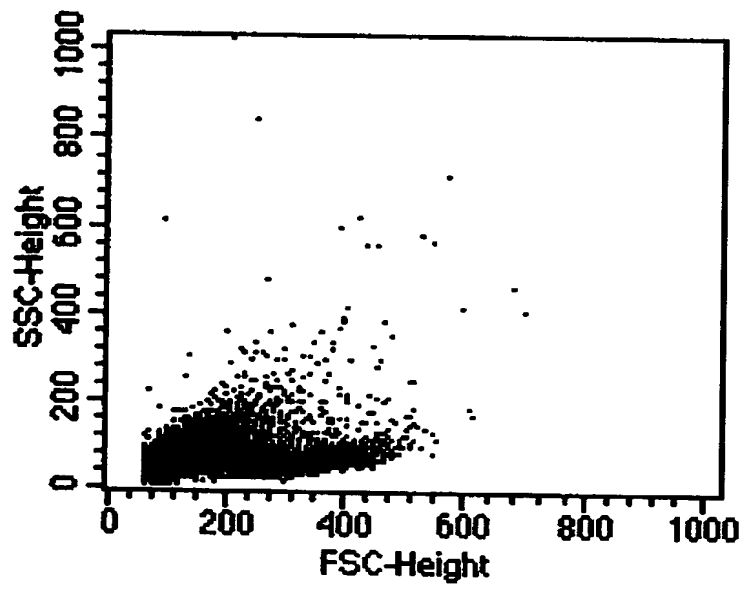
【図16】



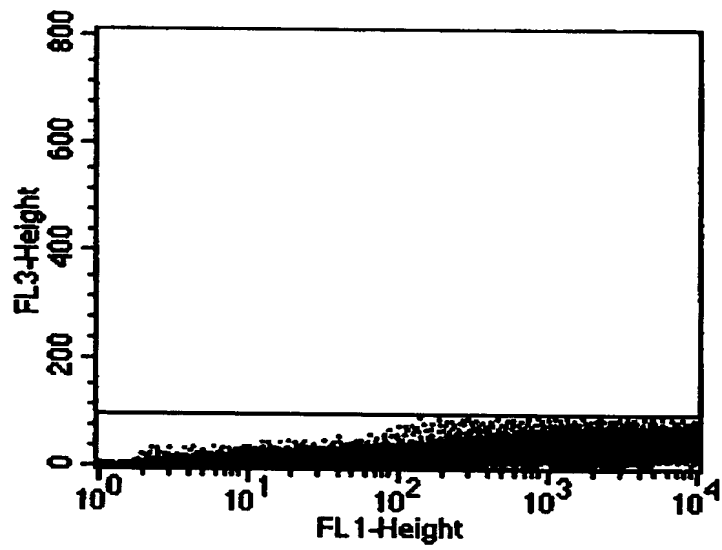
【図17】



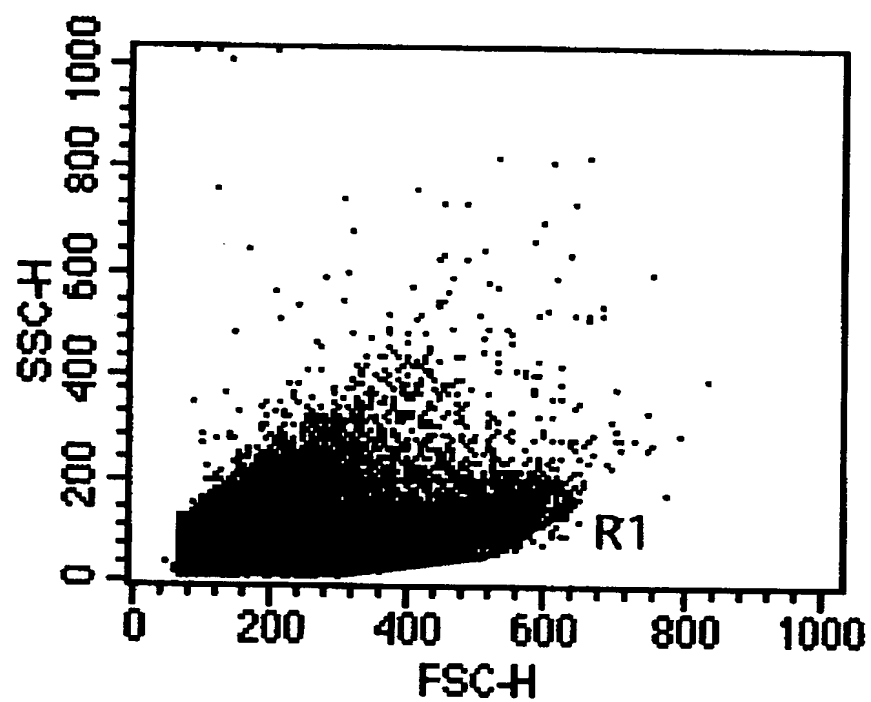
【図18】



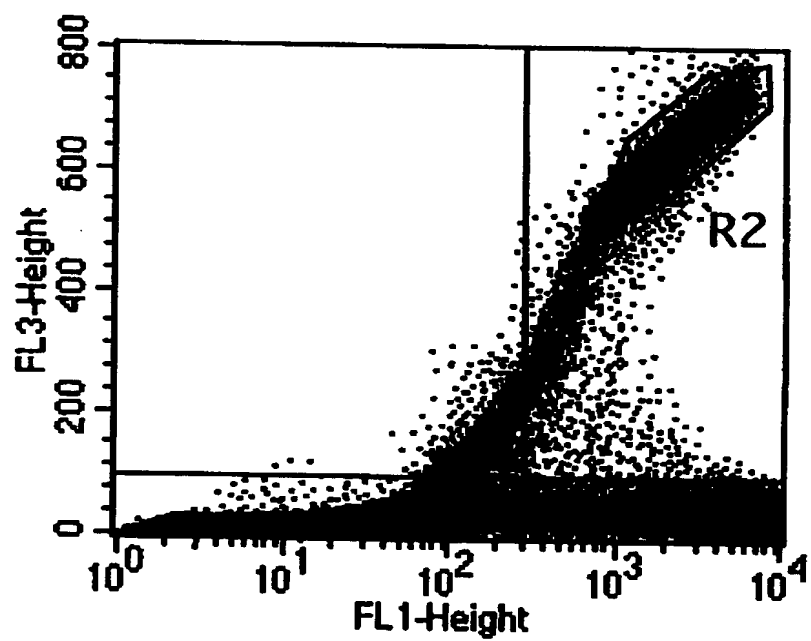
【図19】



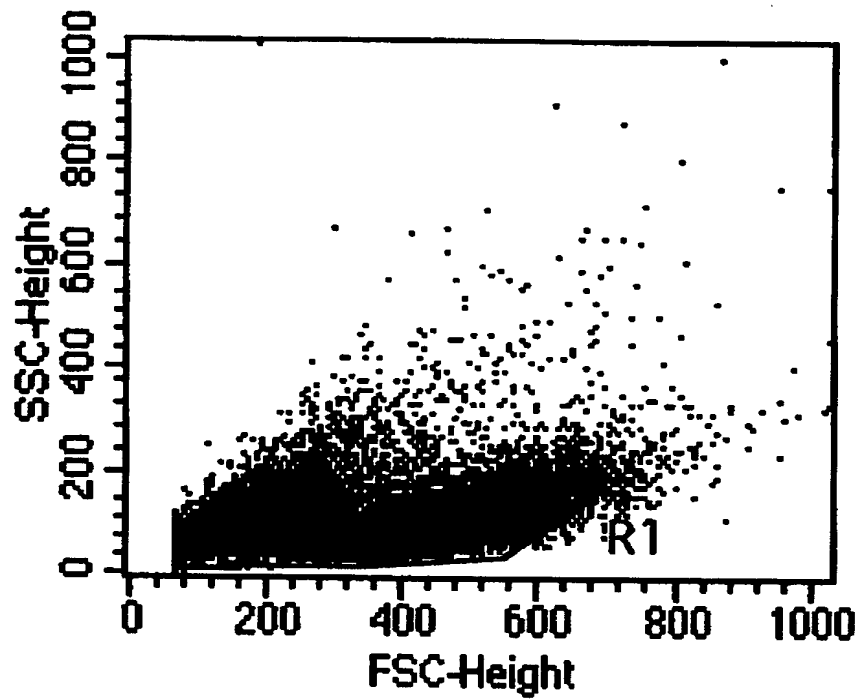
【図20】



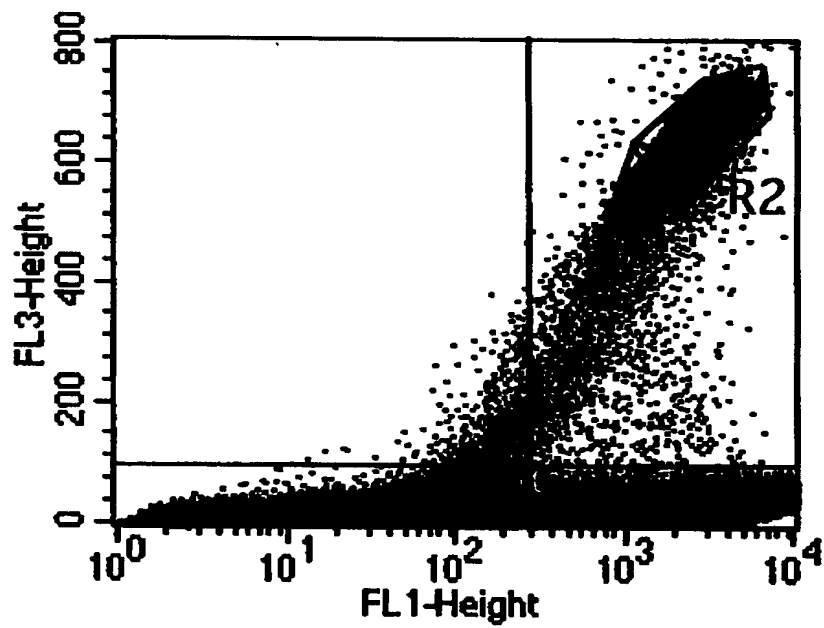
【図21】



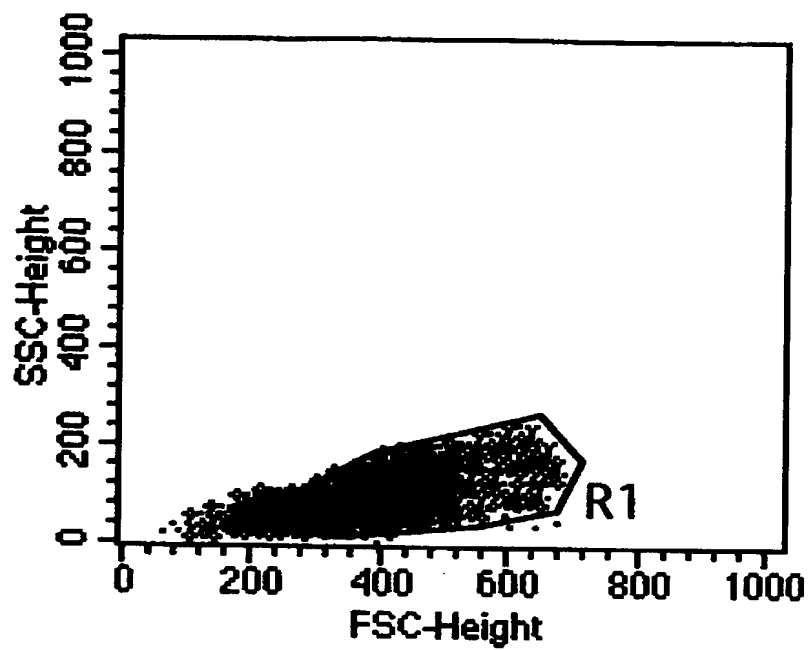
【図22】



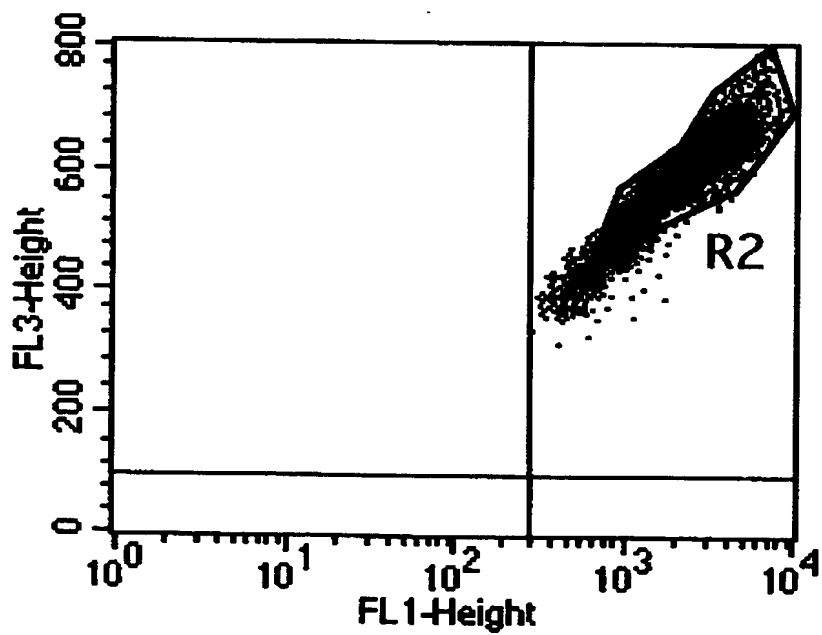
【図23】



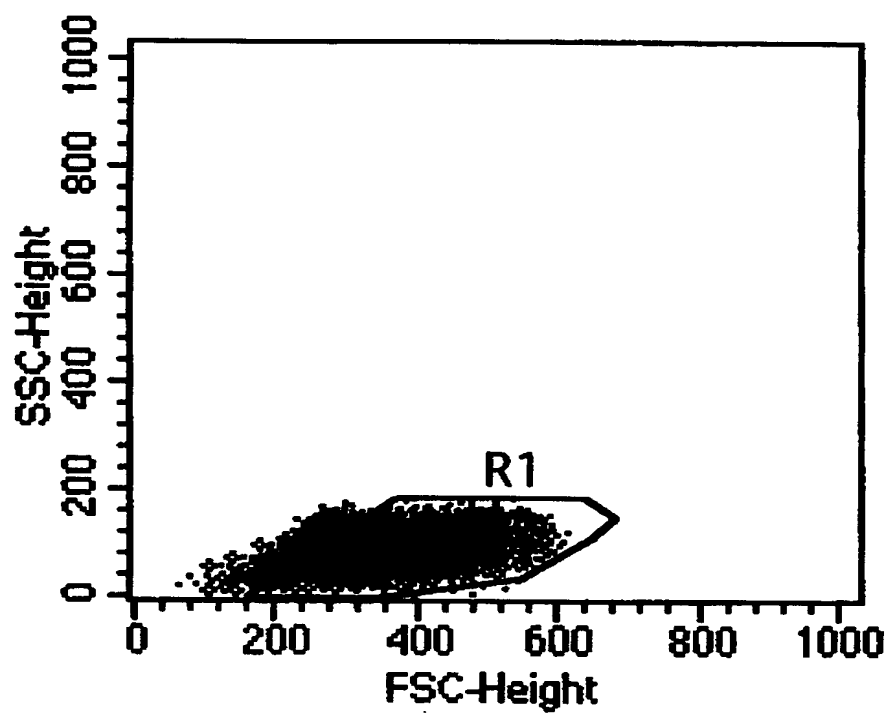
【図24】



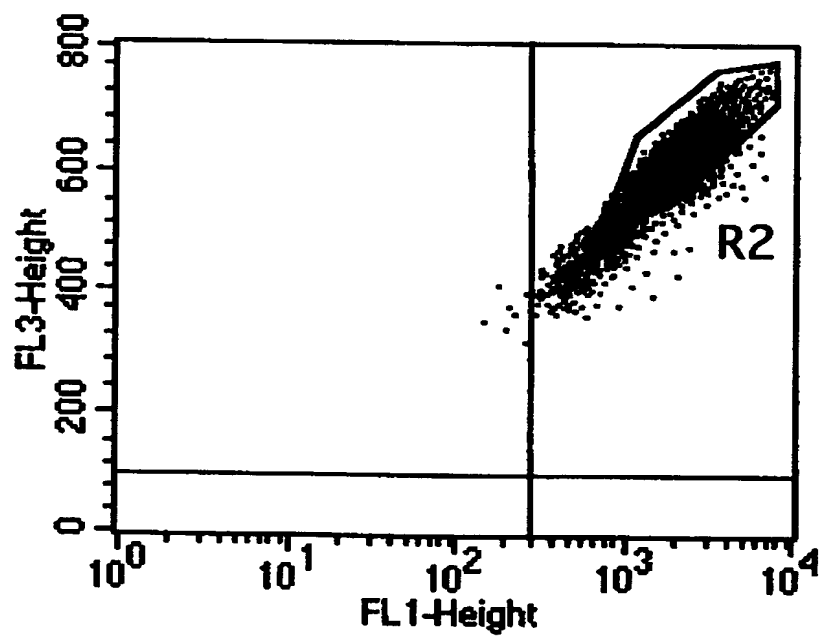
【図25】



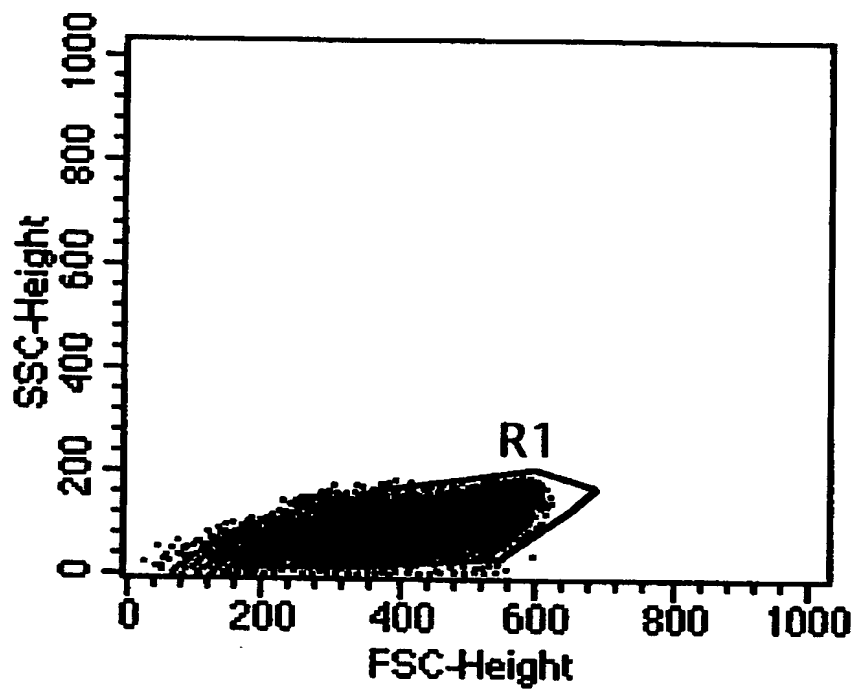
【図26】



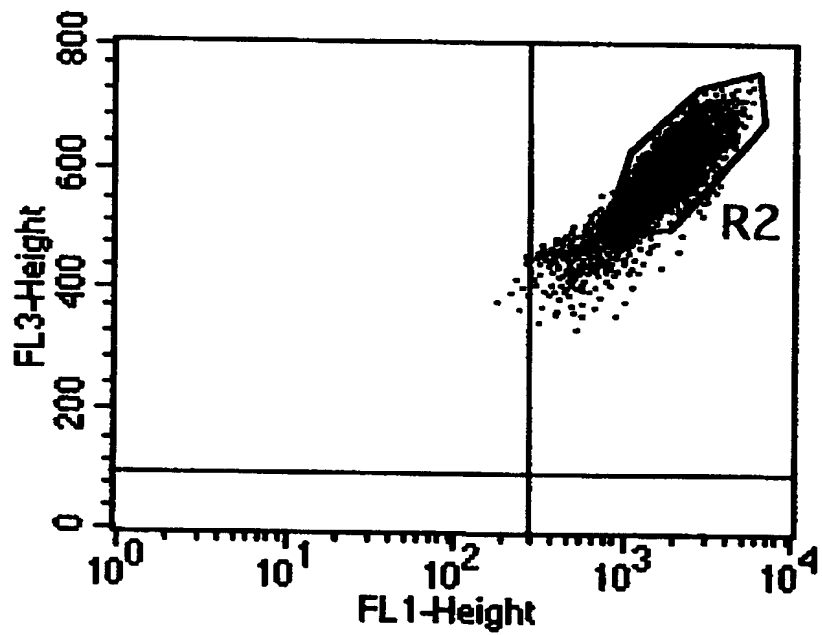
【図27】



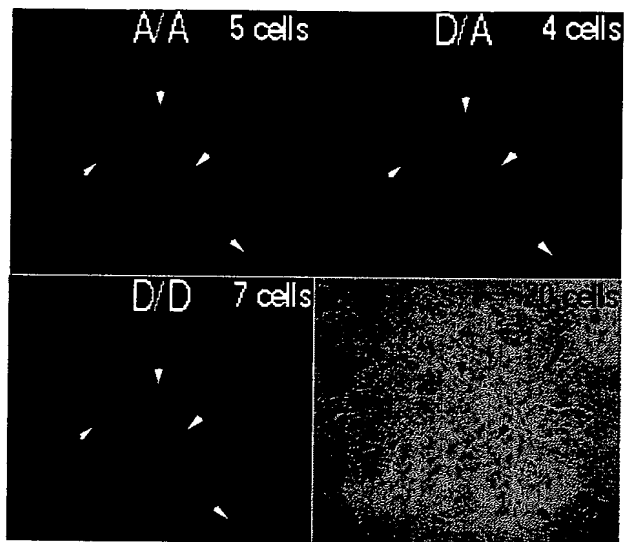
【図 28】



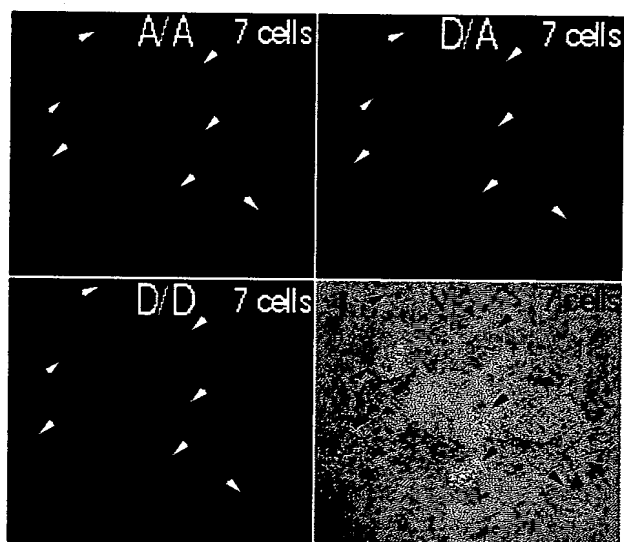
【図 29】



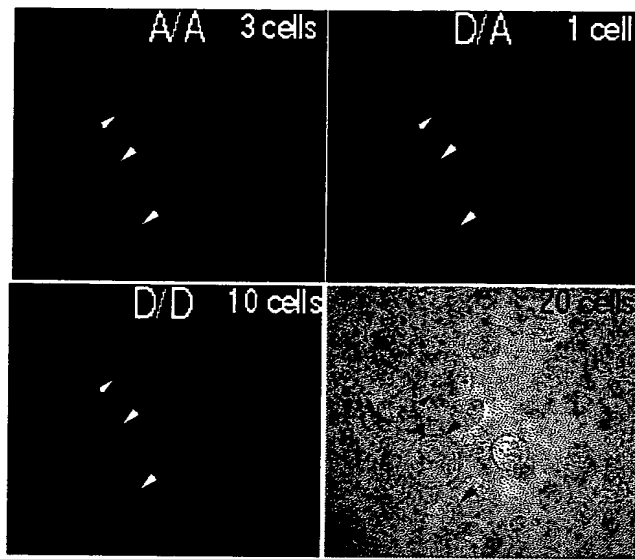
【図 3 0】



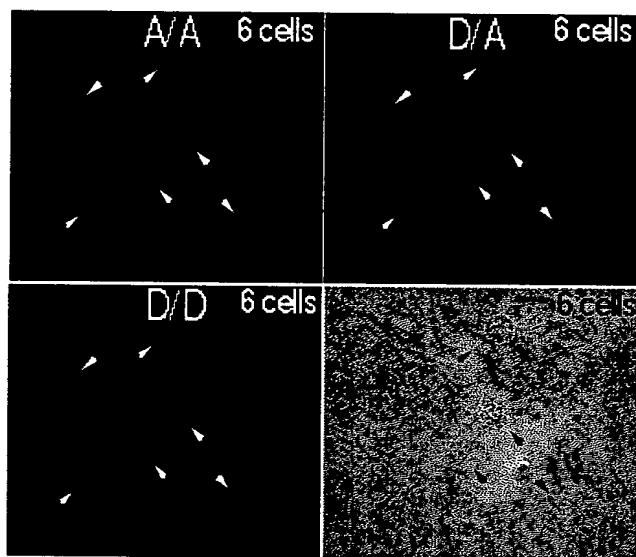
【図 3 1】



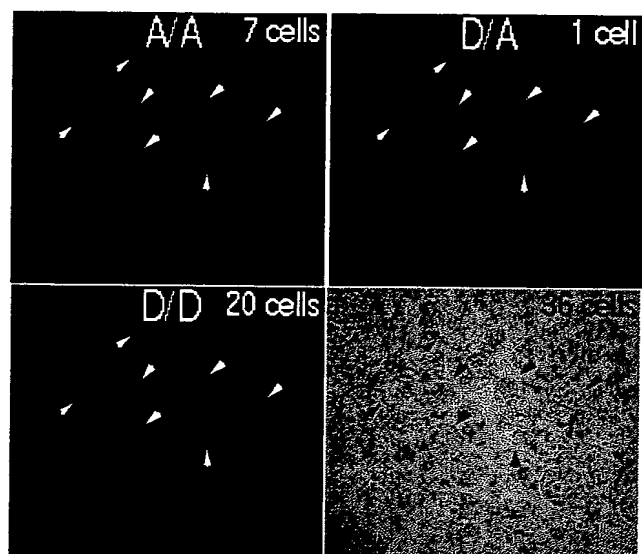
【図 3 2】



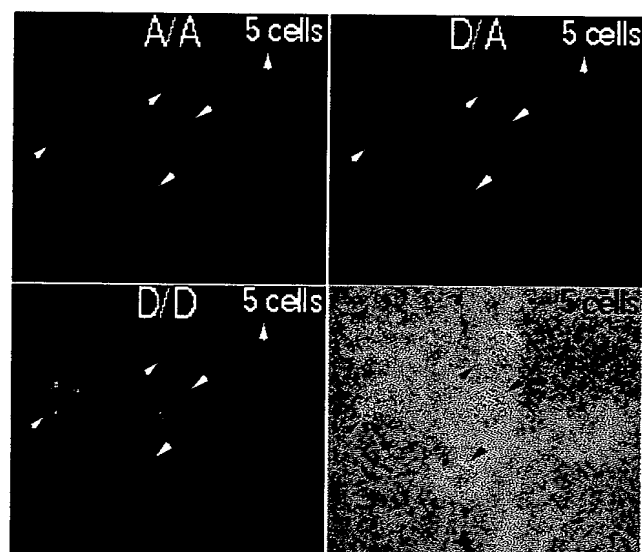
【図 3 3】



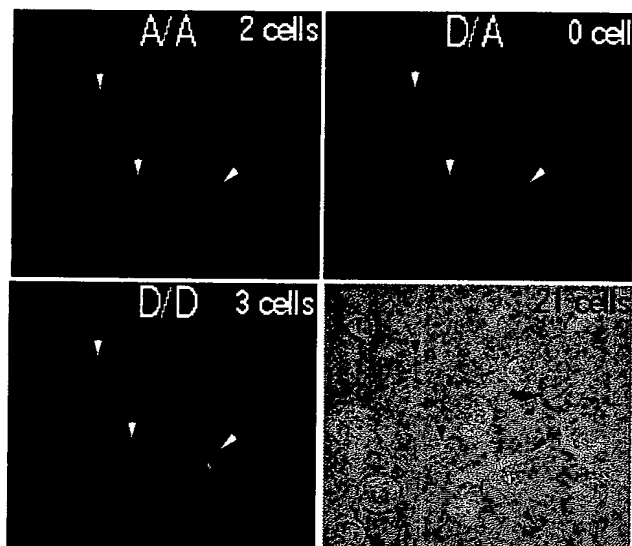
【図 3 4】



【図 3 5】



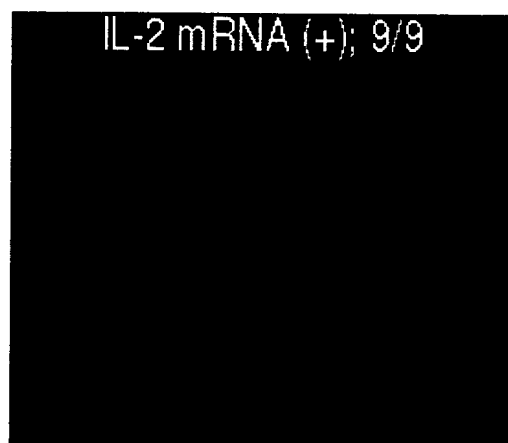
【図 3 6】



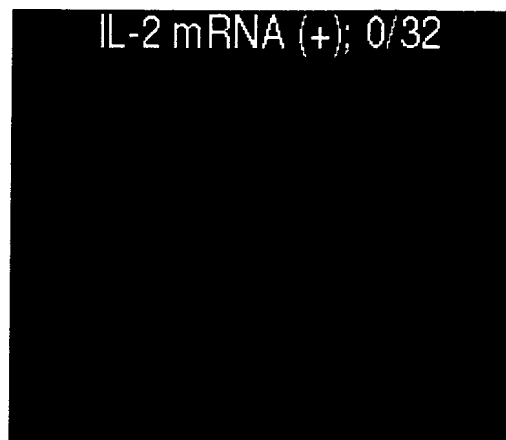
【図 3 7】



【図 3 8】



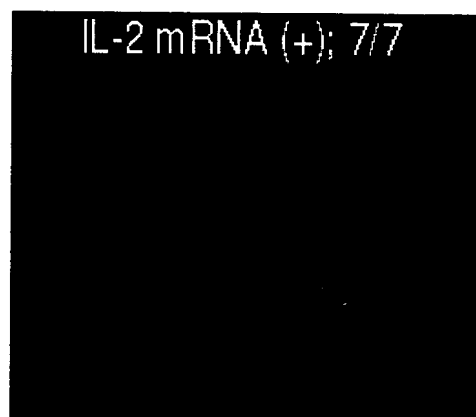
【図 3 9】



【図 4 0】



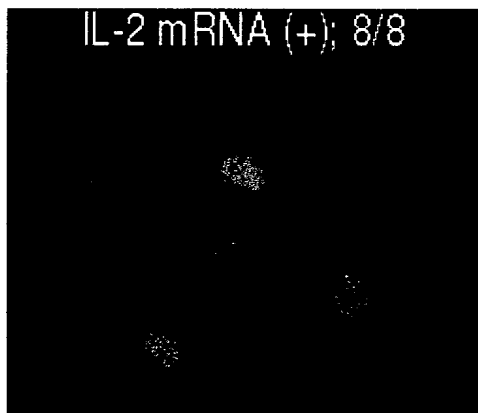
【図 4 1】



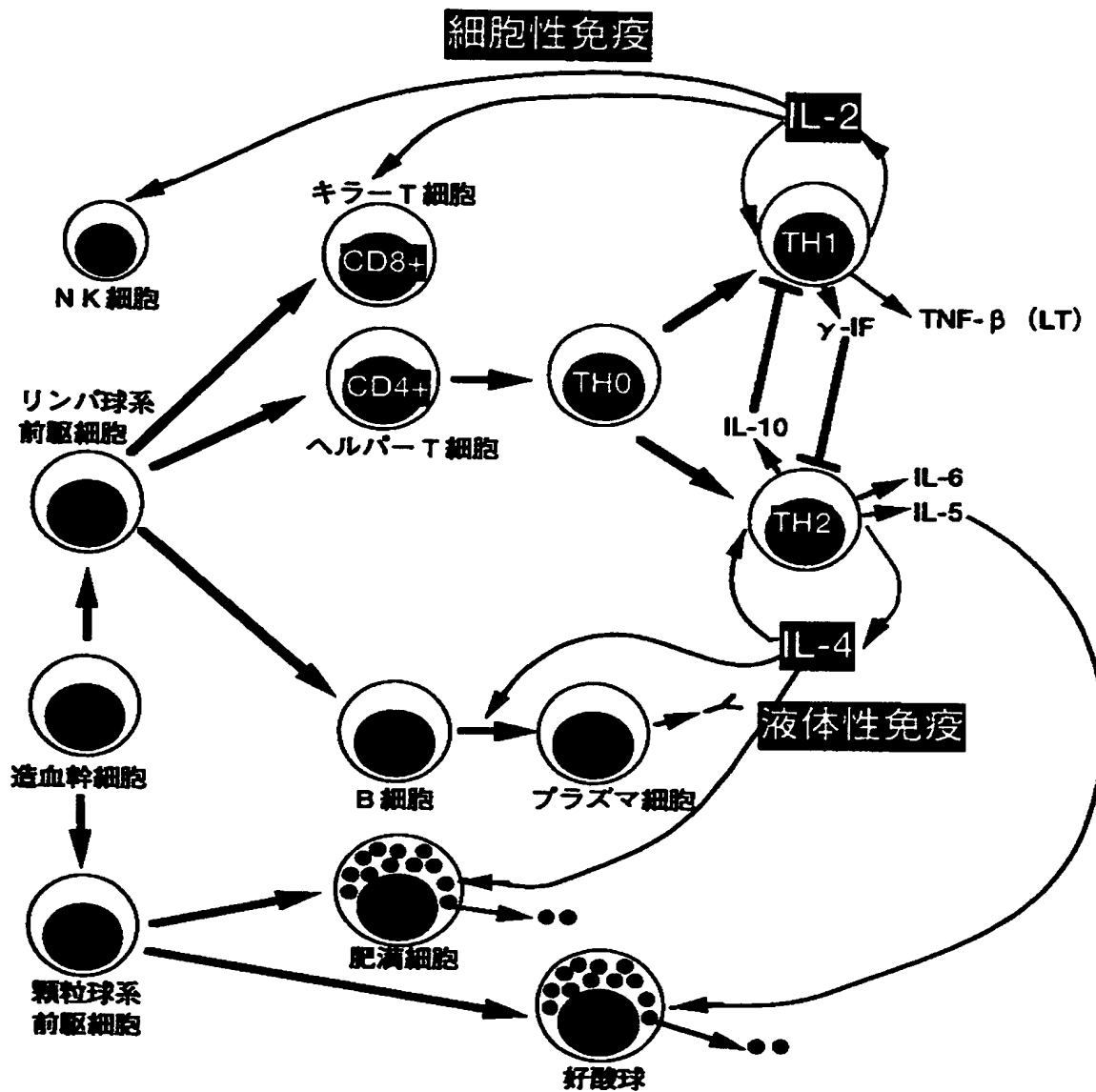
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞にマーカーとして使用可能な細胞表面分子が存在しない場合や、存在しても細胞間で区別ができない場合、さらにはマーカーとなるべき分子が細胞外液中に遊離してしまう場合であっても、目的とする細胞、すなわち特定の遺伝子を発現した細胞を生きたままの状態を選択的に分離取得することが可能な分離方法を提供すること。

【解決手段】 特定の mRNA を発現した生細胞を含む生細胞群の細胞中に、該 mRNA を標識可能な標識剤を導入する第 1 の工程と、前記標識剤で前記 mRNA を標識することにより、標識化 mRNA を含有する生細胞を含む生細胞群を得る第 2 の工程と、前記標識化 mRNA を検出することにより該標識化 mRNA を含有する生細胞を同定し、同定した該生細胞を前記第 2 の工程で得られた前記生細胞群から選択的に分離する第 3 の工程とを含むことを特徴とする特定の遺伝子を発現した生細胞の選択的分離方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595047385]

1. 変更年月日 1995年 3月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 静岡県浜北市平口5000番地
氏 名 株式会社分子バイオホトニクス研究所